

Università di Pisa

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia



TESI DI LAUREA

“Il dosaggio dell’ormone della crescita.
Implicazioni diagnostiche e terapeutiche.”

RELATORE

Chiar.mo Prof. Giuseppe Saggese

CANDIDATO

Carlotta Francesca De Pasquale

Anno Accademico 2013-14

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
1-INTRODUZIONE	pag. 5
1.1 L'ASSE GH-IGF-I	pag. 5
1.1.1 L'ormone della crescita	pag. 5
1.1.2 Il recettore del GH e la trasduzione del segnale	pag. 7
1.1.3 Il fattore di crescita insulino-simile e il suo recettore	pag. 8
1.2 LE FUNZIONI DEL GH	pag. 9
1.3 LA CRESCITA	pag. 10
1.3.1 Crescita e ICP model	pag. 11
1.4 LA BASSA STATURA	pag. 12
1.4.1 Definizione	pag. 13
1.4.2 Eziologia	pag. 14
1.4.2.1 Varianti normali	pag. 14
1.5 DEFICIT DI GH	pag. 17
1.5.1 Definizione	pag. 17
1.5.2 Eziologia e classificazione	pag. 18
1.5.2.1 Deficit di GH genetico isolato	pag. 20
1.5.3 Caratteristiche cliniche	pag. 21
1.5.4 Diagnosi	pag. 22
1.5.4.1 Anamnesi ed esame obiettivo	pag. 22
1.5.4.2 Diagnostica per immagini	pag. 23
1.5.4.3 Esami di laboratorio	pag. 24

1.6	DOSAGGIO DEL GH	pag.	25
1.6.1	Test per il dosaggio del GH	pag .	27
1.6.1.1	Tipi di stimolo storicamente impiegati nella diagnosi di GHD	pag.	28
1.6.1.2	Probelmi interpretativi dei test	pag .	32
1.6.2	La Nota AIFa	pag .	35
1.6.3	Il cut-off per la diagnosi di GHD	pag.	43
1.7	TERAPIA	pag.	45
2-	SCOPO DELLA TESI	pag.	47
3-	PAZIENTI E METODI	pag.	47
3.1	Pazienti e protocollo di studio	pag	47
3.2	Metodi	pag.	48
3.2.1	Valutazione clinico-auxologica	pag.	48
3.2.2	Valutazione endocrinologica	pag.	50
3.2.2.1	Metodiche diagnostiche	pag.	51
3.2.3	Analisi Statistica	pag.	53
4-	RISULTATI	pag.	54
5-	DISCUSSIONE	pag.	64
6-	CONCLUSIONI	pag.	68
	BIBLIOGRAFIA	pag.	70
	RINGRAZIAMENTI	pag.	77

RIASSUNTO

Premessa. L'ormone della crescita, Growth Hormone, (GH) è un ormone prodotto dalle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore, si tratta dell'ormone anabolico per eccellenza che espleta la sua azione in parte autonomamente in parte attraverso fattori di crescita insulino simili appartenenti alla famiglia delle somatomedine (IGF-1).

Il GH è implicato in quel complesso processo che è la crescita e, per questo motivo, una sua carenza rientra tra le svariate cause di bassa statura nel bambino. È per questo che -dopo un'attenta valutazione clinico-auxologica, volta ad escludere tutte le altre potenziali cause- dobbiamo procedere nell'indagine diagnostica in cerca di un deficit dell'ormone della crescita (GHD), indagine che si avvale di stringenti parametri auxologici (quali l'altezza espressa in cm e DS, la velocità di crescita, l'età ossea, la previsione staturale dal target genitoriale) e del dosaggio del GH. La secrezione del GH è pulsatile e varia considerevolmente nel corso della giornata, i livelli sono per lo più così bassi da non essere detettabili e da rendere necessari delle prove di stimolo.

I test di stimolo ad oggi più impiegati sono quelli di tipo farmacologico (ITT, L-DOPA, ARGININA) durante i quali lo stimolo viene somministrato ed il GH misurato ad intervalli di tempo regolari.

Numerosi passi avanti sono stati fatti dalle prime misurazioni degli anni '70, ma nonostante questo restano ancora dei problemi per quanto concerne il dosaggio dell'ormone della crescita e la sua armonizzazione.

Le problematiche principali legate alla molecola stessa sono l'eterogeneità del GH che è presente in diverse isoforme, circolante in monomeri dimeri e oligomeri; l'interferenza delle proteine leganti il GH (GHBP), frammenti della porzione extracellulare del recettore del GH che possono legarsi al GH stesso in circolo. Per quel che riguarda i vari dosaggi i problemi principali sono di due tipi: la diversa specificità anticorpale per diversi epitopi del GH, e l'utilizzo di diversi calibratori. Per definire un paziente affetto da GHD la misurazione laboratoristica del GH a supporto dei dati auxologici, deve avvenire almeno in due diversi test di stimolo

eseguiti in diverse giornate ed il valore di picco ottenuto deve essere rapportato ad un valore soglia prestabilito (cut-off).

Il cut-off per il GH è da molto oggetto di dibattito per la sua arbitrarietà e per la suddetta mancanza di standardizzazione delle metodiche laboratoristiche. La nota 39 dell'Agenzia Italiana del Farmaco, che regola la terapia con ormone della crescita ricombinante rhGH in tutti i bambini e adolescenti affetti da GHD ed in altre condizioni, ha di recente (luglio 2014) portato il valore soglia per la diagnosi di GHD da 10 ng/mL ($\mu\text{g/L}$) a 8 ng/mL ($\mu\text{g/L}$) e questo si ripercuote senza dubbio sulla diagnosi e dunque sulla terapia dei sospetti GHD.

Scopi dello studio. Lo scopo del presente lavoro, iniziato quando ancora il cut-off ufficiale era di 10 ng/mL è di valutare come cambi la diagnosi di pazienti sottoposti a due diverse metodiche laboratoristiche utilizzando due diversi calibratori. Nel momento in cui si è reso ufficiale l'utilizzo del nuovo cut-off di 8 ng/mL abbiamo cercato, oltre che paragonare e correlare i dosaggi, di capire se questo nuovo valore di cut-off sia sovrapponibile al precedente impiegato per la vecchia metodica e quali conseguenze diagnostiche terapeutiche comporti.

Pazienti e metodi. Abbiamo valutato 50 diversi pazienti che si sono rivolti alla Sezione di Endocrinologia della Clinica Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Pisa dal 2002 al 2014, di cui 39 maschi e 11 femmine con un'età media di 10,05 anni \pm 3,9 DS. I pazienti hanno effettuato due diversi test di stimolo tra ITT, L-DOPA, e ARGININA.

I campioni raccolti in tutto sono 63 perché 9 pazienti hanno effettuato sia il test ITT sia il DOPA-test mentre 4 hanno effettuato sia il test di stimolo con l'Arginina che il DOPA-test.

La concentrazione sierica di GH è stata valutata nella U.O. Laboratorio Chimico e di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Pisa con due diversi metodi.

Il primo metodo impiegato nel Laboratorio fino a settembre 2009, utilizzava il kit DPC IMMULITE® ed il calibratore IS 80/505.

Il secondo metodo di laboratorio, entrato in uso a partire da settembre 2009 è il Kit in chemiluminescenza Access® Ultrasensitive hGH commercializzato dalla

Beckman Coulter che utilizza come standard il IS 98/574.

Si tratta in entrambi i casi di chemiluminescenze, ovvero un tipo di dosaggio a sandwich nel quale la fase solida è ricoperta da anticorpi monoclonali murini anti hGH. Il GH del campione si lega all'anticorpo monoclonale in fase solida e, con un altro sito di legame, agli anticorpi policlonali presenti nel kit e coniugati alla fosfatasi alcalina, che rende una reazione luminosa proporzionale alla quantità di hGH presente nel campione.

La concentrazione sierica di GH è stata valutata nel primo caso con il calibratore: IS 80/505. IS 80/505 è di origine pituitaria ed è costituito da un mix di isoforme di GH (20 e 22 kDa, dimeri e oligomeri), sebbene la isoforma da 22 kDa sia quella più rappresentata. Questo calibratore è stato usato fino all'introduzione del nuovo: IS 98/574, costituito da una forma ricombinante di 22 kDa, puro al 95% e che permette una calibrazione del saggio in termini di unità di massa (uno dei principali fattori confondenti era l'utilizzo in passato di misure di conversione dalle unità internazionali adottate nello IS 80/505 alle unità di massa).

Risultati e Discussione. Attraverso il test statistico T di Student a due code per campioni dipendenti abbiamo dimostrato che i valori dei dosaggi effettuati prima del 2009, dunque con l'IMMULITE ed il calibratore 80/505 erano notevolmente più alti rispetto a quando misurati con l'ACCESS standardizzato per l'IS 98/574. La differenza è statisticamente significativa con un p value < 0,05 per tutti e tre i tipi di stimolo.

In più è emerso che, come era logico aspettarsi, esiste una correlazione positiva tra i due dosaggi: cioè coloro che avevano un valore più alto rispetto ad altri prima del 2009, hanno mantenuto valori più alti anche con le nuove metodiche. Questo dato è tornato statisticamente significativo per ITT e L-DOPA, mentre per l'ARGININA la correlazione sembrerebbe inversa, errore dovuto alla scarsa numerosità del campione (7 pazienti vs i 23 dell'ITT e 28 della L-DOPA). Nonostante l'adozione di un cut-off diverso, abbiamo visto che la percentuale di test inferiori al cut off e quindi indicativi di GHD aumenta, col rischio di sovrastimare il deficit.

In totale prima 15 bambini su 58 venivano considerati GHD , contro 27 su 58

attuali. La percentuale che prima ammontava a 25,9% ora ammonta al 46,5%. Se per esempio si adottasse un cut off di 7 ng/mL sarebbero 19 su 58 i campioni valutati GHD, percentuale del 32,7% che si avvicina più alla situazione di partenza valutata con metodiche e valori-soglia antecedenti il 2009.

Come dato accessorio è emersa una maggior prevalenza del sesso maschile rispetto al femminile, probabilmente dovuta, non solo ad un reale dimorfismo del GHD, ma anche ad una maggior attenzione dei genitori alle problematiche staturali quando queste riguardino un maschietto piuttosto che una femminuccia.

Conclusioni. Questo studio si pone in continuità con i recenti lavori riguardanti l'armonizzazione del dosaggio del GH e l'appropriatezza dei cut-off proposti. In accordo con le più recenti raccomandazioni internazionali sulla standardizzazione del dosaggio del GH, solo la forma ricombinante da 22 kDa dovrebbe essere impiegata come calibratore e il valore dell'ormone della crescita espresso in termini di unità massa. Dal momento che si tratta di dati di fondamentale importanza per decidere se iniziare la terapia o meno, una ulteriore standardizzazione nel dosaggio dell'ormone della crescita risulta necessaria.

In questo studio abbiamo valutato l'impatto di differenti calibratori sui valori ottenuti dal dosaggio dell'ormone della crescita e la relazione di questi dati con gli ultimi due cut off proposti, rispettivamente di 10 ng/mL e il più recente di 8 ng/mL. I dati ottenuti hanno confermato che il calibratore 98/574 fornisce valori più bassi di GH rispetto a quello di derivazione ipofisaria, confermando gli studi di Carrozza et al. e di Meazza et al.

Siamo d'accordo con la decisione di portare il cut-off da 10ng/mL a 8 ng/mL, e -alla luce della letteratura- pensiamo che siano necessari altri studi per capire se vi sia una reale necessità di portare il valore soglia a livelli ancor più bassi o meno.

1-INTRODUZIONE

1.1 L'ASSE GH-IGF-I

1.1.1 L'ormone della crescita

L'ormone della crescita, Growth Hormone, è un ormone prodotto dalle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore (cellule acidofile rappresentati il 50% di tutta la popolazione cellulare dell'adenoipofisi) [1] che, a differenza degli altri ormoni prodotti dalla adenoipofisi, non agisce su di una ghiandola target, ma espleta la sua azione direttamente su tutti o quasi i tessuti del corpo umano [2]. Il gene che codifica per il GH ipofisario (GH1) appartiene ad un cluster di 5 geni omologhi che si trova sul braccio lungo del cromosoma 17 e del quale fanno parte anche il gene codificante per la prolattina (PRL) e per una forma di lattogeno placentare [3].

La forma di GH più rappresentata in circolo (circa il 75%) è una proteina di 191 amminoacidi dal peso molecolare di 22 kDa. Attraverso lo splicing alternativo del mRNA si genera anche un'isoforma di GH di 20 kDa che rappresenta invece il 10-15% del GH circolante. Il gene GH2 codifica invece per una proteina espressa dalla placenta, differente dal GH per 13 amminoacidi [4].

La secrezione del GH è pulsatile (Fig.1) e varia in maniera considerevole in base all'età e al sesso con una secrezione giornaliera media maggiore nelle donne [5]. In particolare le oscillazioni giornaliere rispondono al calo della somatostatina e all'incremento improvviso di GHRH, entrambi ormoni di origine ipotalamica,

infuenzati da neurotrasmettitori e dallo stato metabolico.

Il GH stesso e l' IGF-1 stimolano la somatostatina, il GH ha inoltre un'azione di feedback negativo sul GHRH [6].

La Grelina, un peptide di 28 amminoacidi sintetizzato dalle cellule del fondo dello stomaco (ma anche a livello di ipotalamo, cuore, polmoni e tessuto adiposo) rappresenta un legando endogeno del recettore GHS dei GH-secretagoghi ed agisce in maniera sinergica col GHRH [5, 7, 8].

Picchi sporadici di GH si hanno in risposta a stress fisico e psicologico, all'assunzione di pasti proteici, all'ipoglicemia relativa ed il GH si innalza costantemente nelle fasi III e IV del sonno ad onde lente.

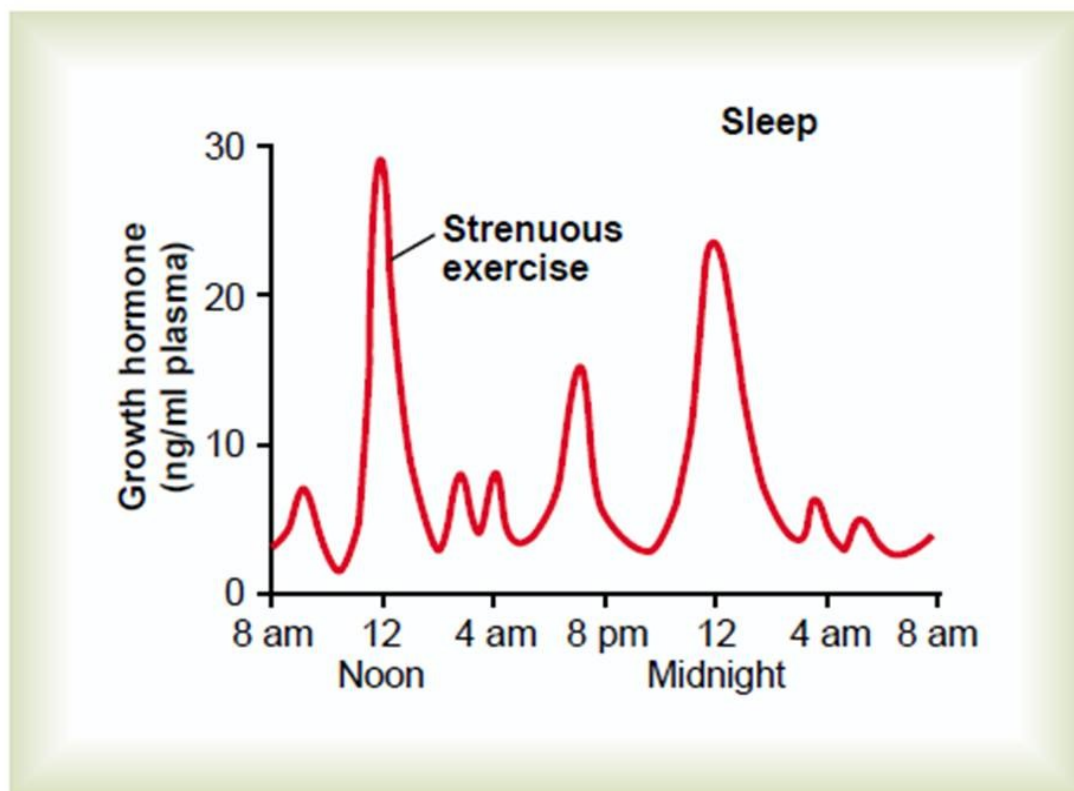


Figura 1. (adattata da: *Guyton AC, Hall JE. Fisiologia Medica; 2001.*)

Il GH circola nel plasma sottoforma di monomeri, dimeri ed oligomeri, complessato per circa il 50% a delle binding proteins (GHBPs) derivanti dalla proteolisi del dominio extracellulare del recettore del GH che modulano il rilascio e la distribuzione del GH a livello tissutale [6].

1.1.2 Il recettore del GH e la trasduzione del segnale

Il recettore del GH fa parte della famiglia dei recettori per le citochine [1] ed è espresso a livello di fegato, tessuto adiposo, rene, cuore, polmoni, intestino, pancreas, cartilagini e muscolo scheletrico [[9]. Una molecola di ormone si lega a due recettori inducendone la dimerizzazione [[10], la kinasi intracellulare associata al recettore Janus Kinases (appartenente alla via di segnale JAK/STAT) si autofosforila e fosforila STAT che trasloca nel nucleo e modula l'espressione genica. [1,5]

In un primo momento, si pensava che il GH promuovesse la crescita somatica attraverso la produzione di un fattore secreto chiamato “Somatomedina C”, il quale si credeva fosse secreto esclusivamente a livello epatico [11].

1.1.3 Il fattore di crescita insulino-simile e il suo recettore

In realtà l'IGF-1 (poiché di questo si tratta) appartiene alla famiglia dei fattori di crescita insulino-simili (IGFs) che mostrano omologie strutturali con la proinsulina ed è sì prodotto a livello epatico previo stimolo del GH [12], ma non solo. A livello extraepatico può agire indipendentemente dal GH con azione autocrina o paracrina così come il GH stesso può espletare le sue azioni anche indipendentemente dall' IGF-1 [13].

L'IGF-1 si trova legato in un complesso ternario con la proteina legante l'IGF (IGF-BP) di tipo -3 o -5 e con la subunità acido-labile (ALS) le quali hanno una funzione di modulare la biodisponibilità dell'IGF-1.

E' stato dimostrato che il legame di STAT-5b a una delle numerose tirosine fosforilate da JAK2 è necessario per l'inizio della trasduzione e per la produzione di IGF-I che ne deriva. STAT-5b, infatti, dopo essere stato fosforilato da JAK2, si stacca dal recettore e forma un omodimero che trasloca nel nucleo e si lega agli elementi cromosomici responsivi al GH. In questo modo viene regolata la trascrizione di geni che codificano per IGF-I, IGFBP3 e ALS [14,15].

L'IGF-1 si lega al proprio recettore (IGF-1R) e con minor affinità anche al recettore per l'insulina (IR) [3] e regola la crescita, la differenziazione, la sopravvivenza delle cellule e la loro progressione nel ciclo cellulare [16].

1.2 LE FUNZIONI DEL GH

Il GH è l'ormone stimolante la crescita per eccellenza [6].

Oltre ai più noti effetti sulla crescita il GH ha numerosi effetti sul metabolismo provocati in parte in maniera diretta, in parte attraverso l'IGF-1.

Il GH favorisce la mobilizzazione degli acidi grassi dal tessuto adiposo (soprattutto a livello del tessuto adiposo viscerale [17]) al torrente ematico rendendoli così disponibili ai fini energetici e ne promuove la differenziazione in adipociti maturi durante la adipocitogenesi [18].

A livello epatico promuove l'uptake di trigliceridi e il loro accumulo, azione che esercita anche a livello del muscolo scheletrico, quindi i trigliceridi possono essere accumulati oppure utilizzati a scopo energetico.

Il GH inibisce la proteolisi e stimola la sintesi proteica, ruolo in parte mediato dall'IGF-1 [3, 19]. A livello cardiaco un deficit di GH in età adulta si associa ad un aumentato profilo di rischio cardiovascolare [20].

Per quanto riguarda la crescita, l'asse GH/IGF-1 è indispensabile al raggiungimento di una normale crescita longitudinale delle ossa durante il periodo post-natale, e gioca un ruolo fondamentale per la crescita e lo sviluppo osseo, determinando l'acquisizione (e il mantenimento in età adulta) della massa ossea insieme con gli ormoni steroidei e all'IGFBP-3 [21].

Il GH agisce stimolando la formazione di colonie dei giovani precondrociti epifisari, e la proliferazione e differenziazione degli osteoblasti, mentre l'IGF-1 agisce su cellule più differenziate e inibisce l'apoptosi degli osteoblasti

promuovendo l'osteoblastogenesi [22, 23].

Le azioni di IGF-1 e GH sull'osso sono dunque diverse ed indipendenti, ma sinergiche.

1.3 LA CRESCITA

La crescita è un fenomeno complesso, orchestrato da molti fattori diversi: genetici, alimentari, ormonali, ambientali che giocano un ruolo importante durante la vita fetale, oltre che post-natale. Durante la vita fetale la crescita è regolata per lo più dalla nutrizione materna e da fattori di crescita quali l'IGF-1 e l'IGF-2, il fattore di crescita dei fibroblasti FGF, il fattore di crescita epidermico EGF, il fattore di crescita trasformante TGF- α e TGF- β , l'insulina; mentre il GH ha un peso minore e interviene nelle ultime settimane di vita intrauterina. L'insufficiente produzione di questi fattori, o la carente nutrizione materna si traducono in un ritardo di crescita intrauterina (IUGR). La scarsa correlazione tra la lunghezza alla nascita ed il mid-parental height (MPH ovvero la media delle altezze genitoriali, alle quali si somma 13 se si tratta di un maschio e si sottrae 13 se si tratta di una femmina per stimare l'altezza target TH) sottolinea l'effetto dominante dell'ambiente intrauterino sul genotipo [5].

1.3.1 Crescita e ICP model

Parlando di crescita è impossibile non nominare l'ICP model di *Karlberg* (Fig. 2), che suddivide l'accrescimento in tre momenti; (i) Infanzia: rappresenta la continuazione dell'accrescimento intrauterino e influenzato soprattutto dalla nutrizione e si protrae dalla nascita fino al secondo anno di età. E' il periodo nel quale l'imponente velocità di crescita che caratterizza l'ultima parte della vita fetale subisce il rallentamento maggiore. (ii) Childhood, la fanciullezza, a partire dai due-tre anni, momento in cui il GH comincia a giocare un ruolo importante, insieme agli ormoni tiroidei; in questa fase la velocità di crescita aumenta leggermente (iii) Pubertà, periodo in cui subentrano gli steroidi sessuali, la velocità di crescita qui raggiunge il picco (spurt) puberale [24]

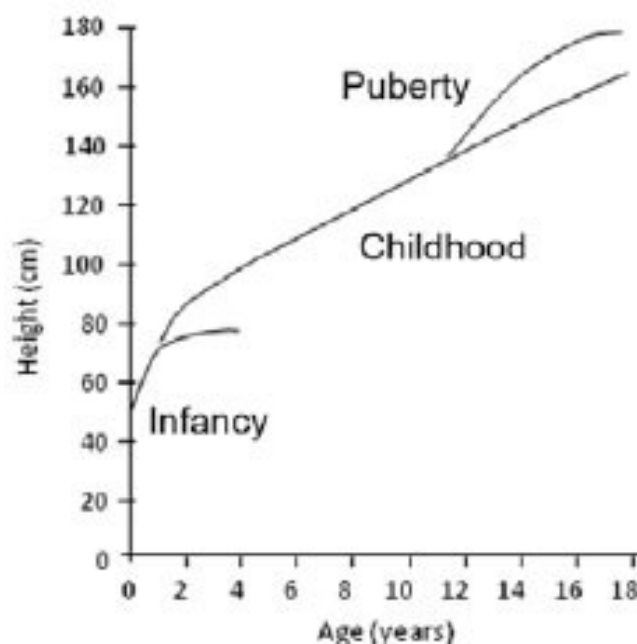


Figura 2.(adattata da: *Patel L, Clayton P. Normal and disordered growth. In: Brook CGD, Clayton P, Brown R, editors. Brook's clinical paediatric endocrinology. Oxford: Blackwell; 2005: 90-112*)

1.4 LA BASSA STATURA

La bassa statura è un motivo frequente di consultazione del pediatra [25]. Le problematiche riguardo la bassa statura sono di natura sociale, oltre che medica [26].

Difatti parlando di “heightism” si intende una sorta di pregiudizio o discriminazione che si abbatte contro gli individui più bassi; l'individuo più alto è in qualche modo associato, nell'immaginario collettivo (ma anche nel mondo reale, come dimostrato da svariati studi) ad una posizione economica e sociale di successo, con un parallelismo che si realizza sin dalla più tenera età, attraverso per esempio, la raffigurazione dei supereroi dei cartoni animati come alti e forti. Questa pressione sociale sembra interessare più il sesso maschile, forse perchè la statura è considerata un parametro importante da parte delle ragazze nella scelta di un compagno, ed influenza il comportamento dei genitori, che si rivolgono al pediatra in maniera più solerte quando ad essere basso sia un maschio rispetto ad una femmina [26]. Riconoscere precocemente una crescita problematica può dunque portare alla diagnosi precoce delle potenziali patologie sottostanti, influenzandone il decorso clinico [[27], incluso un deficit di GH (GHD) dovuta ad insufficienza ipofisaria con ipotiroidismo e insufficienza adrenergica, pericoloso in quanto l'ipoglicemia è la maggior causa di morte nei pazienti affetti da GHD[28] e senza dubbio può correggere un deficit staturale che se scoperto tardivamente potrebbe permanere come tale, dal momento che con la fusione delle cartilagini di crescita alla fine della pubertà, non può esser ottenuto alcun ulteriore incremento staturale e che quando si

corregge un deficit di accrescimento, la velocità di crescita subisce un'accelerazione per riportare il corpo nel proprio canale di crescita, geneticamente stabilito, processo che richiede comunque del tempo.

1.4.1 Definizione

Per bassa statura si intende un'altezza inferiore alle -2DS rispetto alla media per età, sesso ed etnia, un'efficace standardizzazione si ha grazie alle tavole di Tanner, nelle quali la bassa statura si identifica al di sotto del 3° percentile. La velocità di crescita inoltre è ridotta al di sotto del 25° percentile e la previsione staturale del bambino è inferiore al target genetico. [26]

Si stima che il canale di crescita di un bambino progredisca di solito lungo il percentile sul quale si è assestato dopo i 2 anni di età, ed una crescita anomala si riflette nella deviazione dalla curva percentile seguita fino a quel momento.[24] Questo poichè un bambino con una previsione staturale elevata, perchè figlio di genitori molto alti può subire un rallentamento della crescita patologico pur senza risultare basso rispetto alla media per sesso, età ed etnia.

1.4.2 Eziologia

Nell'esaminare le cause di bassa statura, bisogna innanzitutto distinguere quelle che sono le varianti normali e più diffuse: la bassa statura familiare, il ritardo costituzionale di crescita e le forme miste, dalle cause patologiche che a loro volta possono essere di natura endocrinologica o meno [25].

Nonostante l'attenta valutazione clinico laboratoristica, una buona parte dei pazienti resta orfana di una diagnosi precisa e vengono etichettati come bassa statura idiopatica "ISS", ovvero "una statura inferiore a -2 deviazioni standard, in assenza di patologie sistemiche, endocrine, nutrizionali o di anomalie cromosomiche"[29] diagnosticata dopo una completa valutazione endocrinologica pediatrica, comprendente test provocativi del GH [25].

1.4.2.1 Varianti normali

fino all'80% dei pazienti rientrano in questa categoria

BASSA STATURA FAMILIARE [30]

un bambino deve soddisfare i seguenti criteri per esser considerato affetto da bassa statura familiare:

- la previsione staturale rientra (+-10cm) nel MPH
- i genitori o altri parenti di primo grado sono bassi
- l'età ossea è normale e in linea con quella cronologica
- la crescita in genere si mantiene lungo una curva vicina al 3° percentile sulle

tabelle di crescita

- non ci sono altre anomalie anamnestico-cliniche o laboratoristiche

RITARDO COSTITUZIONALE DI CRESCITA [[30, 31]

- La lunghezza alla nascita è normale e il lattante cresce regolarmente per un certo periodo per poi rallentare la crescita e l'incremento ponderale, così da trovarsi, sia per l'altezza che per il peso, sotto il 5° percentile alla fine dell'infanzia (2 o 3 anni).

La maturazione scheletrica rallenta in modo parallelo; l'età ossea più o meno coincide con quella staturale (ovvero l'età alla quale l'altezza sarebbe al 50° percentile), ma entrambe sono in ritardo rispetto all'età cronologica e la velocità di crescita è in linea con l'età ossea.

- Sia i caratteri sessuali secondari che lo spurt puberale sono in ritardo per via di un'insorgenza tardiva della pubertà.
- La statura finale adulta e lo sviluppo sessuale sono normali.
- in famiglia ci sono spesso altri casi di “lenti maturatori”.
- non ci sono altre anomalie anamnestico-cliniche o laboratoristiche.
- l'MPH è normale [31]

Si tratta di una diagnosi che in realtà può essere definita solo retrospettivamente, nel momento in cui un bambino entri in pubertà più tardivamente rispetto ai coetanei ma comunque con una statura nella media [32].

Sono molte le patologie che possono manifestarsi con un deficit staturale [26].

➤ CAUSE NON ENDOCRINOLOGICHE:

- Cause nutrizionali:

deficit di micronutrienti quali Zinco e Ferro, o carenze di macronutrienti dovuti sia ad un diminuito apporto (dieta ipocalorica, Kwashiorkor, anoressia nervosa ed altri disturbi alimentari) o ad un mancato assorbimento come si verifica nelle malattie infiammatorie croniche, nel morbo celiaco, nella fibrosi cistica.

- Difetti cromosomici (sindrome di Turner, sindrome di Down, sindrome di Prader-willi) e sindromi genetiche (sindrome di Russel-Silver, sindrome di Cornelia de Lange, sindrome di Seckel etc).

- Difetti nello sviluppo osseo (acondroplasia, ipocondroplasia, condrodistrofie)

- patologie croniche: renali, cardiache congenite, epatiche, polmonari e infezioni croniche (infezione da HIV o da TBC)

- deprivazione psicosociale

- apporto cronico di farmaci quali glucocorticoidi, estrogeni ed androgeni ad alte dosi

-patologie metaboliche come la mucopolisaccaridosi.

➤ CAUSE ENDOCRINOLOGICHE

-ipotiroidismo

-ipopituitarismo

-sindrome di Cushing

-pubertà precoce

– -deficit isolato di GH: nella forma di deficit classico di GH, di deficit

neurosecretorio di GH e di resistenza al GH.

1.5 DEFICIT DI GH

1.61.5.1 Definizione

Si definisce deficit di GH (GHD) una condizione patologica caratterizzata da anomalie auxologiche, cliniche, biochimiche e metaboliche causate da una secrezione ridotta di GH e da una conseguente riduzione degli ormoni GH-dipendenti e di fattori di crescita [33].

I dati riguardanti l'epidemiologia di questo disturbo non sono sempre uniformi, sia a causa del fatto che il GHD ha una frequenza diversa nei vari paesi, non tanto per una effettiva differenza epidemiologica, quanto per una differente percentuale di diagnosi, inoltre il 25-75% delle diagnosi di GHD risultano essere insufficienze reversibili, legate ad un'immaturità del sistema, che si risolve con lo sviluppo del bambino [5].

Inoltre, come poi vedremo, il fatto che centri diversi utilizzino differenti test per la diagnosi ed il monitoraggio dei pazienti [34], non semplifica le cose. L'incidenza di questo disturbo oscilla tra 1:300-1:4000 [5, 35] e 1:10000 nati vivi, con la maggior parte dei casi che rimangono tuttavia idiopatici [36] anche se con il passare degli anni ed il miglioramento delle tecniche diagnostiche e di imaging questa quota di GHD definiti idiopatici, è in continua diminuzione. [37, 38]

1.5.2 Eziologia e classificazione

E' possibile classificare le cause di GHD in base alla sede anatomica dell'alterazione che conduce al deficit, dividendo le forme ipotalamiche dalle forme ipofisarie e il GHD può essere un deficit isolato di GH, oppure può associarsi ad un'insufficiente produzione di altre tropine ipofisarie [5]. Inoltre può trattarsi di difetti sporadici o a trasmissione ereditaria [5]. Tra le cause di deficit di GH bisogna distinguere quelle congenite da quelle acquisite. (Tab. 1)

Tra le cause acquisite di deficit di GH nel bambino sono importanti i tumori, specialmente i craniofaringiomi, meningiomi, disgerminomi, ma anche le lesioni benigne occupanti spazio come gli adenomi o le cisti aracnoidee o anche della tasca di Rathke. Le metastasi hanno un peso maggiore in età adulta, ma si riscontrano anche nei bambini come ripetizioni della malattia di Hodgkin o del carcinoma nasofaringeo.

I traumi, le irradiazioni e la terapia chirurgica possono danneggiare l'ipofisi, così come le emorragie ipotalamiche o ipofisarie, patologie infiammatorie come l'ipofisite, infettive o infiltrative (sarcoidosi, istiocitosi X, emocromatosi) [36].

EZIOLOGIA DEFICIT GH	
<p>Congenito</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Genetico</i> • <i>Associato a difetti strutturali encefalici</i> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Agenesia del corpo calloso ◦ Displasia setto-ottica ◦ Oloprosencefalia ◦ Encefalocele ◦ Idrocefalo • <i>Associato a difetti facciali della linea mediana</i> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Labbro leporino ◦ Palatoschisi ◦ Incisivo mediano unico superiore 	<p>Acquisito</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Trauma</i> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Perinatale ◦ Postnatale • <i>Infezione</i> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Encefalite ◦ Meningite • <i>Tumori SNC</i> <ul style="list-style-type: none"> ◦ Craniofaringioma ◦ Germinoma ipofisario ◦ Adenoma ipofisario ◦ Glioma del nervo ottico • <i>Istiocitosi a cellule di Langerhans</i> • <i>Post irradiazione cranica</i> • <i>Post chemioterapia</i> • <i>Infarto ipofisario</i> • <i>Disfunzione neurosecretoria</i> • <i>Privazioni psicosociali</i>
Tabella 1: alcune cause di GHD, tratto da [5]	

1.5.2.1 Deficit di GH genetico isolato

Il GHD congenito può essere ritrovato associato a manifestazioni extraipofisarie: difetti strutturali encefalici, oppure a difetti facciali della linea mediana . Tra le cause congenite si ritrova il deficit genetico di GH, del quale sono spesso note le basi molecolari che interessano per lo più geni codificanti per fattori stimolanti la migrazione e la differenziazione in senso ipofisario di cellule dalla Tasca di Rathke, struttura ectodermica dalla quale deriva l'ipofisi [5, 36]. Lo sviluppo embriogenetico dell'ipofisi infatti è regolato da alcuni fattori di trascrizione: HESX1 (responsabile della displasia-setto-ottica SOD, caratterizzata dalla triade: ipoplasia del nervo ottico, anomalie degli ormoni ipofisari e difetti delle strutture cerebrali della linea mediana), LHX3, TTF1 sono fondamentali per il normale sviluppo della tasca di Rathke; PROP-1 e POU1F-1 (analogo umano di Pit-1) [5] sono invece coinvolti nella differenziazione delle linee cellulari in senso ipofisario [38].

Tra i difetti a trasmissione ereditaria si riconoscono classicamente quattro sottotipi di deficit isolati del GH:

IGHD IA: a trasmissione recessiva, alterazioni del gene GH1 comprendenti delezioni e mutazioni frameshift nonsense, si tratta di uno dei deficit più gravi perchè data la totale assenza del GH endogeno spesso si ha la produzione di anticorpi diretti contro il GH ricombinante utilizzato per la terapia.

IGHD IB: anche questo a trasmissione autosomica recessiva, meno grave del precedente per la presenza di una piccola quota di GH endogeno detectabile con i

test di stimolo.

IGHD II: differisce dal deficit di tipo uno per la trasmissione di tipo autosomico dominante, la maggior parte delle mutazioni riguardano l'introne 3 del gene del GH.

IGHD III: trasmissione legata alla X, a volte associato ad agammaglobulinemia [35].

1.5.3. Caratteristiche cliniche

Un deficit grave di GH si manifesta clinicamente sin dai primi giorni di vita con ittero e colestasi [39, 40], ipoglicemia [40] che appare più grave nel caso in cui al GHD si associ un deficit di ACTH [37], micropene che non sembra legato ad un deficit di gonadotropine [41], mancata discesa dei testicoli e ipotiroidismo [5]. La facies può apparire immatura con prominenza delle bozze frontali [5] e un mento poco sviluppato [28]. La maturazione ossea e la dentizione sono ritardate, il tono della voce è acuto e per quanto riguarda la composizione corporea, la massa muscolare è diminuita e aumenta il grasso sottocutaneo[5]. La bassa statura non è armonica, difatti come nella sindrome da insensibilità al GH (nanismo di Laron) [42] le estremità del corpo sono colpite maggiormente rispetto al tronco (acromicria) [43].

Durante l'infanzia, il GHD si caratterizza per un progressivo rallentamento della velocità di crescita, ritardo nella maturazione scheletrica, e ritardo puberale.

Comunque una crescita insufficiente è il segno predominante di un deficit di GH nei bambini.[37]

1.5.4 Diagnosi

La diagnosi di GHD, nell'infanzia richiede un primo fondamentale approccio clinico e auxologico, combinato con i test di stimolo volti a saggiare l'asse GH-IGF e con una valutazione radiologica.

Prima di pensare al deficit dell'ormone della crescita bisogna chiaramente aver considerato ed escluso ogni altra possibile causa di ritardo staturale [44] come per esempio malassorbimenti, la celiachia, le malattie infiammatorie croniche intestinali, patologie epatiche, insufficienza renale, acidosi tubulare renale o ipotiroidismo[37].

1.5.4.1 Anamnesi ed esame obiettivo

Particolare attenzione va posta durante l'anamnesi e l'esame obiettivo alla presenza di ipoglicemia neonatale, ittero prolungato, micropene o parto traumatico; alla storia di irradiazione cranica o di traumi cranici o infezioni del sistema nervoso centrale; alle anomalie craniofacciali della linea mediana anche se più spesso la bassa statura è l'unico segno evidente di un GHD [44].

Il pediatra deve raccogliere informazioni sulla storia familiare, nello specifico sullo sviluppo puberale dei genitori (età del menarca della madre), sulla loro statura e sul pattern di crescita familiare [45].

L'esame obiettivo è incentrato sulla misurazione dei parametri auxologici: l'altezza,

il peso, il calcolo della velocità di crescita espressa in cm/anno e il calcolo del BMI (kg/m^2) valore che va standardizzato secondo l'età del bambino. Per differenziare le forme di bassa statura proporzionata da quelle di bassa statura non proporzionata è necessario eseguire la misurazione della statura da seduto e il rapporto tra segmento superiore e segmento inferiore. Inoltre è utile ricercare la presenza di caratteri dismorfici tipici ed eventualmente procedere con un'indagine scheletrica e con l'analisi molecolare del gene SHOX [46]. La decisione di iniziare le indagini diagnostiche si basa dunque su segni auxologici; l'altezza dovrebbe essere misurata con strumenti appropriati e sia altezza che peso devono essere riportati sulle carte di crescita [37]. La velocità di crescita va estrapolata da misurazioni seriali a distanza di almeno sei mesi [47].

1.5.4.2 Diagnostica per immagini

Dal momento che l'età ossea è di solito in ritardo e che il grado di ritardo è correlato alla gravità e alla durata del deficit, nel caso ci si orienti verso un possibile deficit del GH è opportuno effettuare una radiografia della mano e del polso della mano non dominante, in maniera da raffrontarle poi con le immagini dell'Atlante Radiologico di Greulich e Pyle [48] e/o con il metodo TW2 di Tanner e Whitehouse. Entrambi i metodi sono attendibili nella predizione della statura adulta nei disordini della crescita [44].

Sempre dal punto di vista radiologico la risonanza magnetica nucleare è consigliata

in tutti i bambini con deficit di GH [49], isolato o meno, ad insorgenza tardiva, per escludere un processo occupante spazio; anomalie della linea mediana come l'assenza del setto pellucido sono apprezzabili nei bambini affetti da displasia-setto-ottica, una riduzione nella dimensione dell'adenoipofisi, un peduncolo ipotalamo-ipofisario attenuato od assente e un'ipofisi posteriore che rimane posizionata ectopicamente a livello o subito sotto il *tuber cinereum*, (40-60% dei pazienti con GHD) sono tutti associati a disfunzione ipofisaria [50].

1.5.4.3 Esami di laboratorio

Gli esami laboratoristici devono comprendere un esame emocromocitometrico completo, la VES, la creatinina, gli elettroliti, bicarbonati, calcio, fosfati, fosfatasi alcalina, albumina [25].

Campioni del sangue sono utili anche per verificare lo stato tiroideo attraverso dosaggio di TSH, ft3 e ft4 (dosabili in un campione random di sangue) e del Cortisolo [51], tenendo conto della pulsatilità di quest ultimo [52]; ma anche per la ricerca di anticorpi antigliadina, soprattutto nelle femmine può essere utile un'analisi del cariotipo [51].

Di fondamentale supporto alla valutazione clinico auxologica è il dosaggio dell'ormone della crescita e dell'IGF-1.

1.6 DOSAGGIO DEL GH

Dai dati presenti in letteratura, i bambini con un'altezza sotto il terzo percentile o inferiore alle -2 sds associata ad un rallentamento della velocità di crescita andrebbero investigati per potenziali anomalie dell'asse GH-IGF1 [37], quindi GH, IGF-1, IGFBP-3.

Le linee guida della Consensus della società di ricerca dell'ormone della crescita ha stabilito i criteri auxologici suggestivi di GHD [44] :

- a) Grave bassa statura inferiore o uguale a -3 deviazioni standard

oppure

- b) statura inferiore o uguale a -2 DS e velocità di crescita/anno < -1 DS per età e sesso valutata a distanza di almeno 6 mesi o una riduzione della statura di 0.5 DS/anno nei bambini di età superiore a due anni.

oppure

- c) statura inferiore a -1.5 DS rispetto al target genetico e velocità di crescita/anno inferiore o uguale a -2 DS o inferiore o uguale a -1.5 DS due anni consecutivi

- d) velocità di crescita/anno inferiore o uguale a -2 DS o a 1,5 DS dopo due anni consecutivi, anche in assenza di bassa statura e dopo aver escluso altre forme morbose come causa del deficit di crescita; nei primi due anni di vita, sarà sufficiente fare riferimento alla progressiva decelerazione della velocità di crescita (la letteratura non fornisce a riguardo dati definitivi in termini di

DS);

oppure

- e) malformazioni/lesioni ipotalamo-ipofisario dimostrate a livello neuro-radiologico.

In aggiunta a questi criteri è suggestiva di GHD [44] :

- la presenza neonatale di: ipoglicemia, ittero prolungato, micropene
- la storia di parto traumatico
- l'anamnesi positiva per irradiazione cranica, o per traumi cranici, o infezioni del SNC
- la presenza di consanguineità e/o di un membro familiare affetto
- la presenza di anomalie craniofaciali della linea mediana

La diagnosi di GHD storicamente si basa sulla misurazione della concentrazione di GH in risposta ad uno stimolo, più spesso con un agente stimolante non fisiologico [53].

I classici test di funzionalità endocrina nel bambino consistono nella somministrazione di uno stimolo noto per la produzione di una quantificabile risposta dell'ormone che si ritiene essere deficitario, dal momento che prelievi random di sangue nei bambini si dimostrano inutili (al contrario di alcuni disturbi endocrinologici nell'adulto, come ad esempio l'acromegalia, l'iperprolattinemia e l'iperparatiroidismo, nei quali i dosaggi random di GH, prolattina e paratormone sono diagnostici) [54].

1.6.1 Test per il dosaggio del GH

Per la valutazione dell'ormone della crescita così come per l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), il test di tolleranza all'insulina (ITT) è da molti anni il *gold standard* [51].

Il vantaggio nell'usare l'ITT è che lo stimolo che noi diamo è chiaramente descritto e standardizzato, cioè si produce un'ipoglicemia quantificabile.

Gli stimoli utilizzati per provocare la secrezione del GH agiscono sia attraverso il GHRH che determina l'ampiezza del picco e la somatostatina che ne determina il ritmo [55].

Lo scopo di qualsiasi test diagnostico non è quello di sostituirsi alla clinica, bensì di integrarla in qualche modo, riducendo al minimo le diagnosi di falso positivo o falso negativo.

La sensibilità e la specificità dei test in questione fungono da guida al clinico per interpretare il dato come una conferma o meno della diagnosi. In genere si accettano valori di sensibilità e specificità sopra l'80%. Definire un gold standard è difficile e il valore di cut off per il GH è spesso oggetto di dibattito. Oltretutto la relazione tra la velocità di crescita ed il GH è un continuum [56], e qualsiasi cut off venga scelto per dirimere tra fisiologico e patologico è un compromesso ottenuto bilanciando sensibilità e specificità, ovvero ammettendo che una quota di bambini sani rientri nel gruppo dei deficitari e che una parte di bambini con deficit risulti sufficiente dai test, infatti spesso bambini sani possono avere valori di picco molto bassi, e occasionalmente bambini con

deficit possono rientrare nei valori di sufficienza.

I parametri del test sono i seguenti [51] :

efficienza: la percentuale di tutti i risultati veri positivi o veri negativi.

Sensibilità:
$$\frac{\text{il numero dei pazienti che crescono poco positivi al test}}{\text{il numero totale dei pazienti che crescono poco}}$$

Specificità:
$$\frac{\text{il numero dei bambini che cresce normalmente, che risulti negativo al test}}{\text{il numero totale di bambini che cresce normalmente}}$$

1.6.1.1 Tipi di stimolo storicamente impiegati nella diagnosi di GHD [49]

I test per il GH vengono classicamente divisi in fisiologici e farmacologici, a seconda del tipo di stimolo, il quale si rende necessario vista la secrezione pulsatile durante il giorno, con concentrazioni basse difficilmente detectabili da prelievi random.

TEST DI SECREZIONE FISIOLÓGICI:

1. Test dell'Esercizio: questo test andrebbe eseguito con un cicloergometro e si basa sulla produzione di una quota di lavoro standardizzato. Se eseguito nelle migliori condizioni il test ha un 20% di falsi positivi [54] ma quando non viene eseguito perfettamente ha un basso valore diagnostico.
2. Studi sul Sonno: sono stati usati per studiare la fisiologica secrezione

notturna dell'ormone della crescita, possono essere utilizzati con o senza monitoraggio elettroencefalografico, lo scopo è di ottenere campioni da prelievi intervallati di 15-20 minuti durante lo stadio 3 e 4 del sonno.

3. Dosaggio urinario del GH: questo metodo è stato proposto come un metodo non invasivo per saggiare la secrezione dell'ormone della crescita. Col miglioramento delle tecniche di dosaggi radioimmunometrici ed enzyme-lined immunosorbenti (ELISA) l'aumento di sensibilità ha permesso la misurazione in piccoli volumi urinari.

La variabilità tuttavia è alta e servono almeno due o tre raccolte a notte per arginare il problema.

4. IGF-1 e -Bps. Il dosaggio del fattore di crescita insulino-simile e delle proteine che vi si legano, è di aiuto nella diagnosi di GHD in quanto i valori di IGF-1 sono bassi, oltretutto questo dosaggio è utile per discriminare le situazioni di resistenza al GH e le patologie epatiche.

TEST FARMACOLOGICI PER LA SECREZIONE DEL GH.

Si tratta di test che richiedono tutti un buon accesso venoso. Personale infermieristico e medico devono essere presenti durante la procedura. Tutti questi esami sono stati standardizzati su adulti a digiuno dalla sera precedente, anche nei bambini è preferibile il digiuno dalla mezzanotte, è consentito bere acqua [51].

È opportuno prelevare un campione di sangue 15-30 minuti prima dell'applicazione dello stimolo, questo dosaggio insieme a quello a tempo 0 ci danno un'idea dello stato secretorio del GH quando è stata inserita la cannula [51].

1. ITT: il Test di Tolleranza Insulinica (0.15 U/kg di insulina solubile) deve essere utilizzato solo in unità specialistiche e necessita di strette condizioni di sorveglianza [57]. È un test controindicato in bambini con storia recente di epilessia o convulsioni ipoglicemiche e precauzioni speciali vanno prese nei bambini in cui si sospetti ipopituitarismo [51, 54]. Nel caso di ipoglicemia sintomatica grave ci sono delle procedure d'emergenza da seguire che consistono nel: somministrare glucosio endovena 200mg/kg (10% dextrose 2ml/kg) in 3 minuti, continuare con infusione intravenosa al ritmo di 10mg/kg/min; misurare nuovamente la concentrazione del glucosio con un *dipstick* dopo 4-5 minuti e modificare l'infusione di glucosio per mantenere glicemia a 5-8 mmol/l non di più [57] (corrispondenti a 90-140 mg/dL). La risposta del GH può non esser sufficiente se non si raggiunge un'ipoglicemia adeguata. Un adeguato stimolo ipoglicemico si ha quando il glucosio ematico cala di 2.2 mmol/L (corrispondenti a 40 mg/dL) o meno, se il bambino è sintomatico o se si ha una riduzione del 50% nella concentrazione di glucosio ematico.
2. I prelievi di sangue devono esser effettuati ad intervalli di 30 minuti per 2 ore.

Il pranzo dovrebbe essere somministrato alla fine del test e il bambino non dovrebbe essere mandato a casa per almeno 90 minuti dopo il pasto per assicurarsi che non vomiti.
3. Test al Glucagone: si utilizzava spesso in bambini più piccoli, ma con la dose raccomandata di 0,5 mg si possono comunque incontrare dei problemi

legati ad un'ipoglicemia di rimbalzo dovuta al fatto che il glucagone è un importante secretagogo dell'insulina.

4. Clonidina: stimolo comunemente utilizzato alla dose di 0,15 mg/mq per bocca. L'assunzione della clonidina si riflette in un picco della stessa a 60 minuti dalla somministrazione, ma si associa ad effetti collaterali quali sonnolenza, pallore e a volte una brusca caduta della pressione arteriosa.
5. Arginina Test: l'Arginina è uno stimolo riconosciuto per il rilascio dell'ormone della crescita, l'arginina monoidrocloridrica provoca un rilascio di GH quando infusa per via intravenosa.
6. Somministrata per un periodo di 30 minuti (0,5 g/kg) gli effetti collaterali di nausea e irritazione all'infusione sono minimizzati.
7. DOPA-test. La Levodopa può essere data per os al fine di stimolare il rilascio dell'ormone della crescita, la nausea che ne deriva può limitarne l'uso, anche se la concomitante somministrazione di propanololo ne riduce l'insorgenza. Un picco di risposta non è atteso prima di 90 minuti dopo la somministrazione, quindi è richiesto un periodo di 150-180 minuti per il pieno dosaggio.
8. GHRH test. Serve più che altro a saggiare il pool di GH prontamente rilasciabile. Non testa l'asse ipotalamo-ipofisario.

Un'ulteriore classificazione dei test provocativi dell'ormone della crescita vede la divisione tra *test di screening* (esercizio, digiuno, levodopa e clonidina) che sono di semplice gestione, scarsa tossicità ma bassa specificità; e *test definitivi* (arginina,

insulina e glucagone) [7]. Per migliorare la specificità, si eseguono in genere due diversi test di stimolo [58].

1.6.1.2 Problemi interpretativi dei test

Esistono almeno 34 test sviluppati [37] e le metodiche di dosaggio differiscono tra i laboratori, questo genera difficoltà sia nel comparare dati tra centri diversi che quando si cerchi di stabilire un cut-off tra valori fisiologici e anomali [51]. Ci sono una serie di problemi interpretativi riguardanti i test di stimolo: per esempio quando ci si trovi di fronte ad una concentrazione dell'ormone della crescita aumentata al tempo 0; i test sono fatti per valutare il pattern secretivo, soprattutto il picco dell'ormone subito disponibile al rilascio, se c'è stato un rilascio importante di GH e il pool è basso, la risposta successiva sarà attenuata [58]. Idealmente, prima di ogni test ci dovrebbe essere un periodo di “*run-in*” che si ottiene effettuando un prelievo circa 20 minuti prima di dare lo stimolo così da poter interpretare i dati alla luce dei possibili precedenti episodi secretori [51].

Un altro problema è che la crescita dei bambini varia all'interno di un anno [59]; la secrezione del GH è correlata al tasso di crescita [60] ed è possibile che ci siano alcune discordanze tra test e clinica. Le discrepanze possono essere dovute per esempio ad un momento di crescita particolarmente veloce nel contesto comunque di un periodo di forte rallentamento della crescita e questo pone l'accento sulla difficoltà di raffrontare un anno di crescita con un test effettuato in poche ore. Non ultimo, anzi problema più importante è la riproducibilità di ogni test.

Molti studi hanno dimostrato che la riproducibilità dei metodi di stimolo sia fisiologici che farmacologici utilizzati per la produzione di GH è scarsa, con una variazione notevole inter- e intraindividuale [61, 62]

La GH Research Society consiglia di misurare il GH con anticorpi monoclonali mediante dosaggi a sandwich [63].

La metodica a sandwich, così chiamata poiché l'analita viene legato tra due anticorpi altamente specifici, è una determinazione non competitiva che generalmente comporta la più elevata sensibilità e specificità rispetto ai dosaggi cosiddetti competitivi [60].

I dosaggi che utilizzino anticorpi policlonali riportano valori di GH maggiori.[64, 53]. Gli anticorpi policlonali sono infatti meno specifici e questo fattore gioca un ruolo importante nei confronti di una molecola come il GH, che si trova in circolo in diverse isoforme [52].

Il problema comune ai moderni dosaggi è che pazienti sottoposti a terapia con hGH, potrebbero sviluppare anticorpi anti hGH che interferiscono con il dosaggio causando risultati falsamente bassi.

In più gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro [65].

Nonostante il dosaggio dell'ormone della crescita sia stato introdotto nella pratica clinica da quasi 50 anni, (il primo immunodosaggio è stato riportato da Glick e colleghi nel 1965) [66] nel periodo tra il 1994 e il 1998 c'è stato un netto aumento della variabilità inter-dosaggio, che è schizzata da un 17% iniziale ad un 30%[67],

dovuto in parte alla disponibilità di calibratori dalle diverse caratteristiche, in parte alla presenza delle proteine leganti il GH (GHBP, derivanti dal dominio extracellulare del recettore) le quali sono potenzialmente in grado di bloccare il GH e competere con lui per il legame anticorpale, anche se il loro ruolo non è completamente chiarito [68].

L'utilizzo di due diverse unità di misura (mU/l e μ g/l), l'adozione di svariati fattori di correzione e la varietà nella specificità anticorpale hanno contribuito alle discrepanze tra i laboratori [64, 67].

In tutti i saggi la concentrazione del GH nel campione è letta confrontando il segnale generato dal campione con quello generato da una quantità nota di GH utilizzando curve standard (calibratore) [69].

L'utilizzo in diversi laboratori di diversi standard di calibrazione, è da sempre motivo di scarsa standardizzazione ed eccessiva variabilità interlaboratoristica. Dal 2001 si è reso disponibile il secondo standard internazionale (IS 98/574) per il GH ricombinante, con un'attività del valore di 3,0 IU/mg[70], calibrato sull'isoforma più attiva di GH di 22kDa con una purezza superiore al 95%, questo standard ha sostituito il precedente IS 80/505 contenente un misto di isoforme del GH sia di 22kDa che di 20kDa, sia dimeri che oligomeri, con un'attività di 4.4 IU/ampolla [71].

Il fatto che non fosse riportata un'unità di massa non ha impedito che queste ultime venissero comunque adottate sfruttando un fattore di conversione da unità (U) a microgrammi (μ g) che ondeggiava tra 2 e 3 [67].

Attualmente il fattore di conversione, che rappresentava un ulteriore fattore

confondente, si è reso uno strumento non più necessario, grazie all'adozione del nuovo standard.

Come primo passo nella standardizzazione del dosaggio dell'ormone della crescita, nella consensus del 2006 si raccomanda che vengano riportate le concentrazioni di GH in microgrammi per litro riferendosi all' IS 98/574 (1 mg corrispondente a 3 unità internazionali di GH) [72].

Dal momento che l'utilizzo del GH a scopi terapeutici è definito - in Italia attraverso la nota AIFA numero 39 - ma anche nel resto del mondo, oltre che dalle caratteristiche auxologiche precedentemente definite, dai risultati dei test provocativi, è fondamentale che ci sia una standardizzazione dei vari dosaggi in maniera da correggere le discrepanze dovute ad un utilizzo dei diversi kit presenti sul mercato per evitare che i pazienti abbiano un diverso accesso alla terapia con GH [63].

1.6.2 La Nota AIFa [73]

Le Note limitative prodotte dall'Agenzia Italiana del Farmaco, che nascono nel 1993, a seguito dell'istituzione del nuovo Prontuario Terapeutico del Servizio Sanitario Nazionale sono uno strumento normativo volto a definire gli ambiti di rimborsabilità di alcuni medicinali.

Nel 1993 le Note erano 59, attualmente ne contiamo 42.

Tra gli strumenti che regolano l'accesso ai farmaci, le Note, più di altre norme, si

ispirano ai criteri della medicina basata sulle prove di efficacia. Si fondano cioè sui risultati, criticamente valutati, di sperimentazioni cliniche randomizzate e, possibilmente, multiple. La revisione periodica delle Note risponde, quindi, appieno all'esigenza di aggiornare le limitazioni rispetto alle nuove evidenze disponibili nella letteratura scientifica. Nel corso del tempo, infatti, le Note hanno subito un'evoluzione nei contenuti e nelle finalità, sempre per tenere conto delle novità emerse sull'efficacia dei singoli farmaci o sulla presenza e frequenza di reazioni avverse [73].

Il problema dell'appropriatezza delle prescrizioni non interessa solo l'Italia, ma è una preoccupazione presente un po' in tutto il mondo. Diverse nazioni hanno preso, quindi, strade differenti per cercare di promuovere l'uso corretto dei farmaci. In Italia e in Francia si è preferito adottare lo strumento delle Note. In altri Paesi, come ad esempio in Gran Bretagna e negli Stati Uniti, si fa grande uso, invece, delle Linee Guida. L'uso dei due sistemi, tuttavia, non è necessariamente alternativo, in quanto Note e Linee guida possono essere utilizzate in modo complementare [73].

La Nota AIFA numero 39 regola la prescrizione dell'ormone della crescita a scopi terapeutici:

La prescrizione a carico del SSN, su diagnosi e piano terapeutico di centri specializzati, Università, Aziende Ospedaliere, Aziende Sanitarie, IRCCS, individuati dalle Regioni e dalle Province autonome di Trento e Bolzano, è limitata alle seguenti condizioni:

Primi 2 anni di vita

Al di sotto di 2 anni di vita non è necessario praticare i test farmacologici se la RMI ha dimostrato una anomalia della adenoipofisi associata a quella del peduncolo o/e della neuroipofisi in un bambino con decelerazione della velocità di crescita o segni clinici riferibili a ipopituitarismo e/o ipoglicemia.

Età evolutiva

Bassa statura da deficit di GH definito dai seguenti parametri clinico-auxologici e di laboratorio:

I. Parametri clinico – auxologici:

a) statura ≤ -3 DS

oppure

b) statura ≤ 2 DS e velocità di crescita/anno $< -1,0$ DS per età e sesso valutata a distanza di almeno 6 mesi o una riduzione della statura di 0,5 DS/anno nei bambini di età superiore a due anni.

oppure

c) Statura inferiore a -1,5 DS rispetto al target genetico e velocità di crescita/anno ≤ -2 DS o $\leq -1,5$ DS dopo 2 anni consecutivi

d) velocità di crescita/anno ≤ -2 DS o $\leq -1,5$ DS dopo 2 anni consecutivi, anche in assenza di bassa statura e dopo aver escluso altre forme morbose come causa del deficit di crescita; nei primi 2 anni di vita, sarà sufficiente fare riferimento alla progressiva decelerazione della velocità di crescita (la letteratura non fornisce a

riguardo dati definitivi in termini di DS);

oppure

e) malformazioni/lesioni ipotalamo-ipofisario dimostrate a livello neuro-radiologico; associate a

II. Parametri di laboratorio:

a) risposta di GH $< 8 \mu\text{g/L}$ a due test farmacologici eseguiti in giorni differenti

b) risposta di GH $< 20 \mu\text{g/L}$ nel caso il test impiegato sia GHRH + arginina

Altre condizioni in cui è ammesso il trattamento con rGH in età pediatrica:

- sindrome di Turner citogeneticamente dimostrata;
- deficit staturale nell'insufficienza renale cronica;
- soggetti affetti dalla sindrome di Prader Willi, geneticamente dimostrata, normale funzionalità respiratoria e non affetti da obesità **severa (definita con BMI $> 95^{\circ}$ centile)**, **diabete mellito non controllato**, **sindrome dell'apnea ostruttiva nel sonno esclusa** mediante polisonnografia, tumore in fase attiva, psicosi attiva;
- soggetti con alterata funzione del gene SHOX, geneticamente dimostrata;
- bambini nati piccoli per l'età gestazionale (SGA - Small for Gestational Age).

Per accedere al trattamento con GH in individui nati SGA è necessario rispondere ai seguenti criteri:

- peso alla nascita $\leq -2 \text{ DS}$ ($< 3^{\circ}$ centile) per l'età gestazionale, basato sulle tavole di Bertino
- e/o
- lunghezza alla nascita -2 DS secondo le tavole di Bertino

- età al momento dell'inizio della terapia con GH uguale o superiore ai 4 anni
- statura inferiore o uguale a -2,5 DS e velocità di crescita inferiore al 50° centile.

Età di transizione

Viene definita età di transizione quella compresa tra il momento del raggiungimento della statura definitiva del soggetto trattato e l'età di 25 anni.

Al raggiungimento della statura definitiva non è più indicata la terapia con GH nelle seguenti patologie:

- sindrome di Turner;
- insufficienza renale cronica
- soggetti nati piccoli per età gestazionale (SGA).
- soggetti con alterata funzione del *gene* SHOX.

Al raggiungimento della statura definitiva la terapia con GH può essere proseguita senza ulteriori rivalutazioni nelle seguenti patologie:

- deficit di GH causato da mutazione genetica documentata
- panipopituitarismo congenito o acquisito organico, inclusa la sindrome di Prader Willi.

Al raggiungimento della statura definitiva la terapia con rGH negli altri soggetti con deficit di GH può essere proseguita solo se presentano dopo almeno un mese dalla sospensione del trattamento sostitutivo con rGH:

- risposta di GH <6 µg/L dopo ipoglicemia insulinica (ITT);

oppure

- risposta di GH <19 µg/L dopo test farmacologico con GHRH + arginina.

Al raggiungimento della statura definitiva la terapia con rGH nei soggetti con

sindrome di Prader Willi può essere proseguita se presentano: a) tre deficit ipofisari associati; b) risposta di GH dopo test farmacologico con GHRH + arginina $<4.1 \mu\text{g/L}$ dopo almeno un mese dalla sospensione del trattamento sostitutivo con rGH.

Età adulta

E' indicata la terapia con rGH in pazienti adulti (con BMI $<29.9 \text{ kg/m}^2$), con età maggiore di 25 anni, se presentano un picco di GH dopo test dell'ipoglicemia insulinica (ITT) $<3 \mu\text{g/L}$ oppure dopo test GHRH + arginina $<9 \mu\text{g/L}$; per pazienti obesi (BMI $>30 \text{ kg/m}^2$) il picco di GH dopo GHRH + arginina dovrà essere $<4 \mu\text{g/L}$.

Per

- a) ipopituitarismo post ipofisectomia totale o parziale (chirurgica, da radiazioni);
- b) ipopituitarismo idiopatico, post ipofisite autoimmune, post trauma cranio-encefalico, da terapie chirurgiche o radianti per neoplasie sellari e parasellari, da sella vuota primitiva, da Sindrome di Sheehan.
- c) pazienti con deficit congenito di GH da causa genetica dimostrata.

Background (MOTIVAZIONI E CRITERI APPLICATIVI)

Età evolutiva

In soggetti con statura $<-3 \text{ DS}$ oppure statura $<-2 \text{ DS}$ e velocità di crescita/anno $<-1 \text{ DS}$ rispetto alla norma per età e sesso, misurata con le stesse modalità a distanza di almeno 6 mesi e con normale secrezione di GH, la terapia può essere effettuata solo se autorizzata dalla Commissione Regionale preposta alla sorveglianza epidemiologica ed al monitoraggio dell'appropriatezza del trattamento con GH in

base alle più recenti acquisizioni scientifiche in materia. Il dosaggio non dovrà superare 50µg/kg/die (raccomandazione EMA). Nei casi autorizzati dalla Commissione regionale, ma non compresi nelle indicazioni contenute nella presente nota AIFA, l'uso è da ritenersi off-label ed è, pertanto, soggetto alla normativa in materia.

Nei soggetti con deficit isolato di GH, senza anomalie neuro-radiologiche e in assenza di mutazioni genetiche, è consigliabile effettuare il re-testing durante il periodo puberale, prima del raggiungimento della statura definitiva.

Età adulta

Soggetti adulti con deficit di GH presentano un quadro clinico sindromico che comprende un peggioramento della qualità di vita misurato con test psicometrici validati, una riduzione della forza muscolare, un aumento dell'adipe viscerale che, insieme ad un peggioramento del metabolismo lipidico, costituisce un fattore di rischio per complicanze cardiovascolari che precocemente possono portare a morte questi pazienti.

Il trattamento sostitutivo con GH biosintetico va comunque riservato solo ai casi nei quali vi sia un severo deficit di GH all'interno di un appropriato contesto clinico e dimostrato secondo i parametri sopra riportati.

Il test GHRH + arginina e il test ITT sono considerati parimenti test di prima scelta sulla base di estesi studi consegnati alla letteratura e riconosciuti a livello di Consensus Conference Internazionali. E' raccomandato che questi test siano usati

con riferimento a limiti di normalità specifici per ognuno dei test (vedi sopra). Il rigoroso rispetto di tali criteri clinici ed ormonali esclude la possibilità di un uso improprio o eccessivo del farmaco.

Sorveglianza

L'Istituto Superiore di Sanità è incaricato della sorveglianza epidemiologica nazionale mediante un Registro informatizzato dell'ormone della crescita (GH) in collaborazione con le Commissioni Regionali identificate dalle singole Regioni. La registrazione delle prescrizioni è condizione vincolante per la rimborsabilità della terapia da parte del SSN. Annualmente l'Istituto Superiore di Sanità provvederà a redigere un rapporto e ad inviarlo all'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e alla Conferenza degli Assessori alla Sanità delle Regioni e Province autonome.

Dal momento che l'utilizzo del GH a scopi terapeutici è definito, in Italia attraverso la nota AIFA numero 39, ma anche nel resto del mondo, oltre che dalle caratteristiche auxologiche precedentemente definite, dai risultati dei test provocativi, è fondamentale che ci sia una standardizzazione dei vari dosaggi in maniera da correggere le discrepanze dovute ad un utilizzo dei diversi kit presenti sul mercato per evitare che i pazienti abbiano un diverso accesso alla terapia con GH [63].

Ci sono almeno 34 test sviluppati [37] e le metodiche di dosaggio differiscono tra i laboratori, questo genera difficoltà sia nel comparare dati tra centri diversi che quando si cerchi di stabilire un cut-off tra valori fisiologici e anomali [51].

Una delle critiche più frequentemente mosse nei confronti dei cut off del GH è che questi sono decisi arbitrariamente e che ogni dosaggio ha delle caratteristiche di specificità e sensibilità tali da rendere spesso validi per una metodica, ma non per un'altra, questi cut-off.

1.6.3 Il cut-off per la diagnosi di GHD

Quando negli anni '60 si rese disponibile la terapia con un derivato dell'ormone della crescita, le scorte disponibili erano molto limitate e fu anche per questo motivo, per far in modo che il farmaco fosse destinato a chi più avrebbe risposto, che si stabilì che il cut-off necessario per confermare la diagnosi di GHD fosse 3ng/mL [51].

Negli anni 1980, grazie all'introduzione del GH sintetico, l'utilizzo terapeutico risultò molto più accessibile, quindi nonostante l'aumento di specificità dei nuovi test, il cut-off venne alzato da 3 a 7ng/mL in un primo momento, fino a 10 ng/mL, [49] validato negli anni '60-'70, usando anticorpi policlonali e un metodo radioimmunometrico [69], ma utilizzato nella pratica clinica fino a pochi mesi fa (giugno 2014) . Questo dato è stato rivisto ulteriormente dall'Agenzia Italiana del Farmaco e portato, con l'ultima modifica del 05/07/2014 della nota 39 ad un valore di 8ng/mL.

Come già affermato, lo spettro dei valori del GH misurati è un continuum tra pazienti con deficit e bambini sani [56].

Questo pone l'accento su come ogni qualvolta si scelga un cut off prendendo in

esame variabili quantitative continuee, si debba scendere al giusto compromesso tra sensibilità e specificità di un test.

Infatti all'aumentare del cut off, inevitabilmente aumenterà la sensibilità ma diminuirà la specificità [74]. Cioè riuscirò a identificare più soggetti realmente malati, ma mi troverò di fronte ad una percentuale maggiore di falsi positivi, ovvero di soggetti sani diagnosticati come malati.

Viceversa al diminuire del cut off aumenterà la specificità (cioè avrò meno falsi positivi) ma a scapito della sensibilità [74], il rischio sarà quindi di includere falsi negativi (bambini con GHD diagnosticati come sani).

Da questo si evince che la decisione del cut off, oltre ad essere strettamente inerente al tipo di test, ha un peso importante sulla terapia dei pazienti

1.7 TERAPIA

Il primo utilizzo terapeutico di GH fu nel 1956, si trattava di GH di origine bovina. [75]

Fino al 1985 il GH veniva ottenuto da estratti dalla ghiandola ipofisaria, ed era disponibile esclusivamente per la terapia dei GHD più gravi [76]. Difatti, da quando nel 1958-1959 si iniziò a ricavare GH dall'ipofisi, per poter trattare un paziente con 1mg di GH al giorno, servivano più di 360 ipofisi umane all'anno; per questo l'utilizzo di GH era limitato ai casi più gravi approvati dai protocolli stabiliti dalla National Pituitary Agency (NPA) nel 1961 [73]. Nel 1985 un paziente morì per la malattia da prioni Creutzfeld-Jacob (CJD) dovuta alle precedenti iniezioni di hGH.[75]Per questo motivo e per il fatto che la tecnologia del DNA ricombinante era ormai in grado di produrre quantità illimitate di GH, l'estrazione di GH dall'ipofisi cessò definitivamente [73].

Inoltre, grazie alla disponibilità di GH ricombinante sintetico (rhGH), la terapia col GH si è resa fruibile, non solo anche per la cura dei deficit meno gravi, ma si è visto che ne beneficiavano anche altre categorie di pazienti [[76]: sindrome di Turner [77], SHOX [78], insufficienza renale cronica [79], sindrome di Prader-Willi [80], sindrome di Noonan [81], bambini nati piccoli per l'età gestazionale (SGA) [82] e basse stature idiopatiche (ISS) [25].

Quasi trenta anni di esperienza con l'utilizzo di GH ricombinante (rGH) hanno mostrato che la la terapia con rhGH è sicura [76, 83].

2- SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare l'influenza dell'utilizzo di due diversi metodi di dosaggio (entrambi chemiluminescenze) con due standard internazionali diversi nella misurazione dei livelli di GH e le conseguenti implicazioni diagnostico-terapeutiche.

Abbiamo analizzato i valori del picco di GH dopo test di stimolo con due differenti Kit: il DPC IMMULITE ® (ora Siemens IMMULITE ®) e l'ACCESS® Ultrasensitive hGH, standardizzati il primo per lo standard IS 80/505, il secondo con il più nuovo standard IS 98/574.

Questo lavoro è nato precedentemente all'ultima modifica della Nota AIFA 39, avvenuta nel mese di giugno 2014, volendo porre l'accento sulla necessità di un cambiamento del cut off diagnostico del GH, verosimilmente verso valori più bassi vista la maggior specificità dei nuovi standard internazionali e dei nuovi dosaggi impiegati.

Con la modifica, avvenuta contemporaneamente alla raccolta dei dati, della nota AIFA 39, che ha comportato il viraggio del cut-off da 10µg/L a 8µg/L lo studio, che si basa su una casistica della sezione Endocrinologica della Clinica Pediatrica di Pisa, cerca dunque di interpretare e correlare le due metodiche di dosaggio e di capire se questo nuovo valore di cut off sia sovrapponibile al precedente impiegato per la vecchia metodica e quali conseguenze diagnostico terapeutiche comporti.

3- PAZIENTI E METODI

3.1 Pazienti e protocollo di studio

Lo studio ha esaminato 50 soggetti tra i pazienti che si sono rivolti alla Sezione di Endocrinologia della Clinica Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Pisa dal 2002 al 2014, di cui 39 maschi e 11 femmine con un'età media di 10,05 anni \pm 3,9 DS.

Abbiamo raccolto i dati di 29 pazienti che hanno effettuato il test di stimolo L-DOPA prima e dopo il 2009. Di questi 22 erano di sesso maschile e 7 di sesso femminile con un'età media di 9,45 anni con DS di \pm 4,69.

Da questa prima selezione un paziente è stato escluso dallo studio perchè aveva recuperato il deficit nel corso della crescita.

I pazienti sottoposti all'ITT sono 27 dei quali 5 femmine e 22 maschi, con un'età media di 10,22 anni e DS di \pm 3,51. 4 di questi pazienti sono stati scartati in quanto trattati e risultati GH sufficienti (GHS) al retest.

Abbiamo quindi analizzato i dati di 23 pazienti sottoposti a ITT con età media di 10,48 e DS \pm 3,63

Abbiamo raccolto i dati di 7 pazienti che hanno effettuato il test di stimolo all'Arginina, di cui 6 maschi ed una femmina. L'età media di questi pazienti è di 10,14 anni con DS di \pm 5,08.

I campioni esaminati sono in tutto 63 questo perchè 9 pazienti hanno effettuato sia il test ITT sia il DOPA-test mentre 4 hanno effettuato sia il test di stimolo con

l'Arginina che il DOPA-test.

I pazienti si sono rivolti all' Endocrinologia della Clinica Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana a causa di uno scarso accrescimento staturale. Presso la suddetta Clinica sono stati valutati dal punto di vista clinico-auxologico e dal punto di vista laboratoristico per escludere altre cause di bassa statura, successivamente sono stati effettuati i test di stimolo per appurare la presenza di un GHD.

3.2 Metodi

3.2.1 Valutazione clinico-auxologica

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un'attenta valutazione clinico-auxologica. Nello specifico è stata raccolta l'anamnesi fisiologica e patologica prossima e remota del bambino e dei familiari, con particolare attenzione al periodo perinatale, alla crescita staturale e all'eventuale sviluppo puberale. Inoltre è stato condotto un attento esame obiettivo con costruzione della curva di crescita, calcolo della velocità di crescita e del target genetico.

La statura dei pazienti è stata misurata con uno statimetro montato a muro ed espressa sia come valore reale misurato in cm, sia come DS rispetto alla media per età, sesso e razza. Sono state raccolte anche le precedenti misurazioni della statura, ad intervalli di tempo di circa 6 mesi, in modo da ricostruire la curva di crescita completa sulle tavole dei percentili di Tanner [24].

La velocità di crescita, espressa in cm/anno, è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\frac{h2(cm) - h1(cm)}{\text{intervallo di tempo (mesi)} / 12}$$

Inoltre è stata espressa anche come DS per l'età cronologica e il sesso, in accordo con i valori di Tanner et al.[24].

Lo sviluppo puberale è stato valutato secondo il metodo di Tanner e Whitehouse.

Il target genetico (TH) è stato stabilito in base alla statura dei genitori e al sesso del paziente, utilizzando le seguenti formule:

$$\text{TH (maschi)} = \frac{(\text{altezza del padre} + \text{altezza della madre}) + 13 \text{ cm}}{2}$$

$$\text{TH (femmine)} = \frac{(\text{altezza del padre} + \text{altezza della madre}) - 13 \text{ cm}}{2}$$

I pazienti sono stati sottoposti a radiografia del polso e della mano non dominanti che viene confrontata con l'Atlante Radiologico di Greulich e Pyle per valutarne l'età ossea [48].

3.2.2 Valutazione endocrinologica

Di ogni soggetto è stato dosato il GH basale ed è stata valutata la secrezione dell'ormone in seguito alla somministrazione di due diversi stimoli farmacologici tra i seguenti:

- Test con Arginina (Arginina Cloridrato 30% S.A.L.F. Spa laboratorio farmacologico), somministrata e.v. in circa 30 minuti alla dose di 0,5 g/Kg. Il dosaggio del GH è stato effettuato ai tempi -30, 0 (basale), +20, +40, +60, +80 e +100 minuti.

- Test con Insulina rapida (HUMALOG® fl 100UI/ml – Eli Lilly Italia), somministrata e.v. alla dose di 0,1 U/Kg. Il dosaggio del GH è stato effettuato ai tempi -20, 0 (basale), +20, +40, +60, +80 e +100 minuti, con contemporaneo dosaggio della glicemia.

- Test L-Dopa (Sinemet® 100 mg + 25 mg cp - MSD), somministrata per os alla dose di 290 mg/m². Il dosaggio del GH è stato effettuato ai tempi -20, 0 (basale), +20, +40, +60, +80, +100 e +120 minuti.

3.2.2.1 Metodiche diagnostiche

La concentrazione sierica di GH è stata valutata nella U.O. Laboratorio Chimico e di Endocrinologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Pisa con due diversi metodi.

Il primo metodo impiegato nel Laboratorio fino a settembre 2009, utilizzava il kit DPC IMMULITE ® ed il calibratore IS 80/505.

L'Analizzatore per Immunodosaggi Automatizzati IMMULITE ® è uno strumento per l'esecuzione di esami in chemiluminescenza totalmente automatizzato: dalla dispensazione del campione sierico, al lavaggio, all'aggiunta del substrato. La reazione chemiluminescente alla base della tecnologia IMMULITE ® è generata dall'interazione tra il reagente marcato con fosfatasi alcalina e il substrato. Da tale interazione si determina una emissione di luce che è direttamente proporzionale alla quantità di analita originariamente presente nel campione di siero.

Nello specifico la fase solida (sferetta) è ricoperta con anticorpi monoclonali murini diretti contro il GH umano (hGH). Il reagente contiene fosfatasi alcalina (da intestino di vitello) coniugata con anticorpo policlonale di coniglio anti-hGH. Il reagente e l'hGH sono incubati insieme con una sferetta coattata con un anticorpo monoclonale murino anti-hGH per formare un complesso. Il coniugato enzimatico non legato è quindi rimosso attraverso un lavaggio a centrifuga. Infine, viene aggiunto il substrato chemiluminescente alla provetta di reazione e il segnale generato è proporzionale all'enzima legato.

In particolare, la concentrazione sierica di GH è stata valutata con il calibratore IS 80/505. IS 80/505 è di origine pituitaria ed è costituito da un mix di isoforme di GH

(20 e 22 kDa, dimeri e oligomeri), sebbene la isoforma da 22 kDa sia quella più rappresentata. Questo calibratore è stato usato fino all'introduzione del nuovo GH 98/574, costituito da una forma ricombinante di 22 kDa, puro al 95% e che permette una calibrazione del saggio in termini di unità di massa.[69]

Il secondo metodo di laboratorio, entrato in uso a partire da settembre 2009 è il Kit in chemiluminescenza Access® Ultrasensitive hGH commercializzato dalla Beckman Coulter che utilizza come standard il IS 98/574.

Si tratta di un dosaggio a sandwich nel quale la fase solida paramagnetica è anche in questo caso ricoperta da anticorpi monoclonali murini anti hGH. Il GH del campione si lega all'anticorpo monoclonale in fase solida e, con un altro sito di legame, agli anticorpi policlonali, in questo caso di capra, coniugati alla fosfatasi alcalina. Dopo ciò che non si è legato alle particelle paramagnetiche viene perso attraverso il lavaggio, mentre ciò che si era precedentemente legato viene mantenuto attraverso un campo magnetico. Dopodiché il substrato chemiluminescente Lumi-Phos* 530 viene aggiunto alla provetta e la luce generata dalla reazione viene misurata con un luminometro. La produzione di luce è anche in questo caso proporzionale alla concentrazione di hGH del campione.

3.2.3 Analisi Statistica

I parametri clinico-auxologici sono stati espressi come media — deviazioni standard (SD).

La correlazione tra i valori dei campioni di GH analizzati col metodo vecchio e quelli analizzati con la nuova metodica è stata valutata mediante l'impiego del test statistico T di Student a due code per campioni dipendenti è stato considerato significativo un valore di $p < 0,05$.

4-RISULTATI

Come illustrato in figura 3, di 27 pazienti che sono stati sottoposti all'ITT, 22 sono maschi e 5 femmine corrispondenti a una percentuale di 81,5% per i maschi e 18,5% per le femmine.

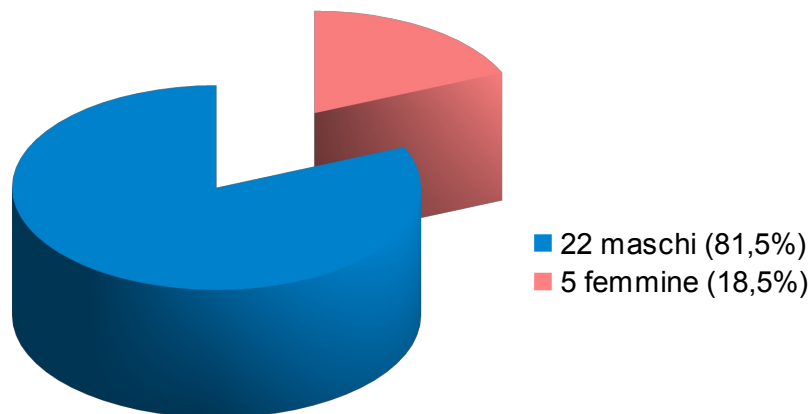


Figura 3. L-DOPA

In figura 4 si vede che dei 7 pazienti sottoposti al test all'Arginina, 6 sono maschi, corrispondenti ad una percentuale dell'85,7% mentre 1 è femmina, corrispondente ad una percentuale del 14,3%.

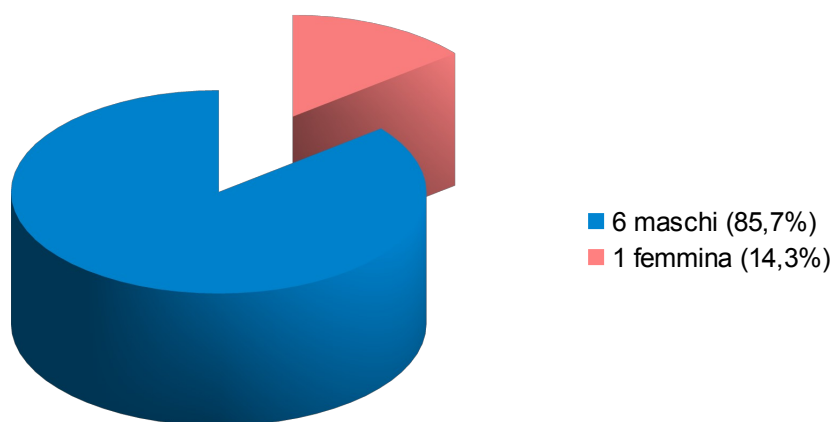


Figura 4. ARGININA

Come illustrato in figura 5, di 29 pazienti che sono stati sottoposti all'ITT, 22 sono maschi e 7 femmine corrispondenti a una percentuale di 75,9% per i maschi e 24,1% per le femmine.

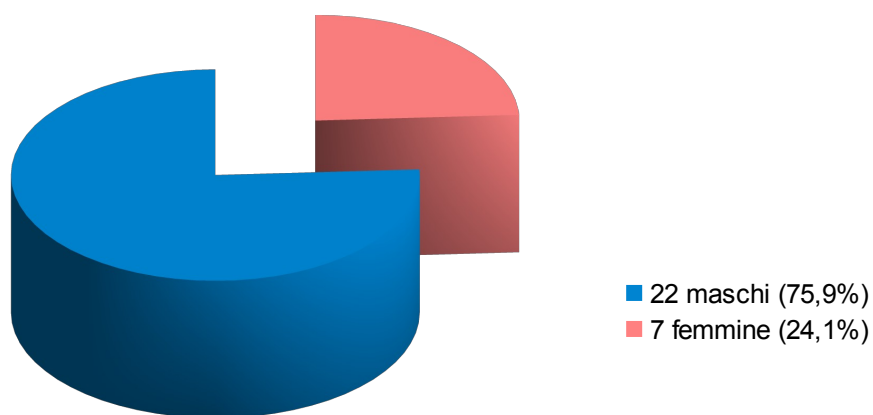


Figura 5. ITT

La totalità dei pazienti è di 50 bambini con 39 maschi e 11 femmine, rappresentanti rispettivamente il 78% e il 22% (Figura 6.)

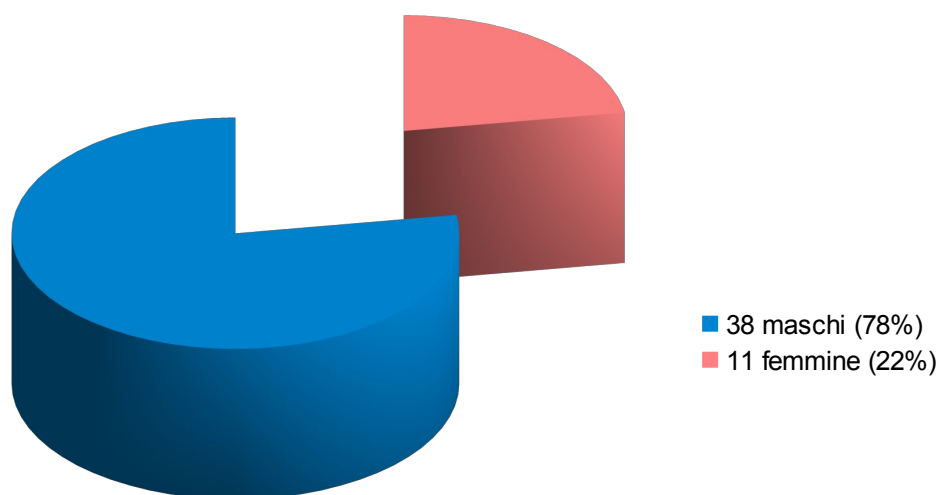


Figura 6. Totatlità pazienti

Stimolo impiegato ITT :

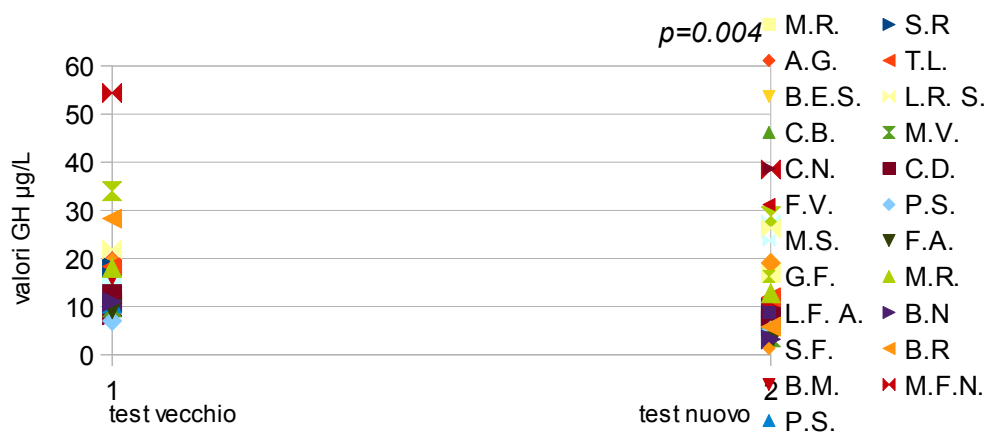


Figura 7.

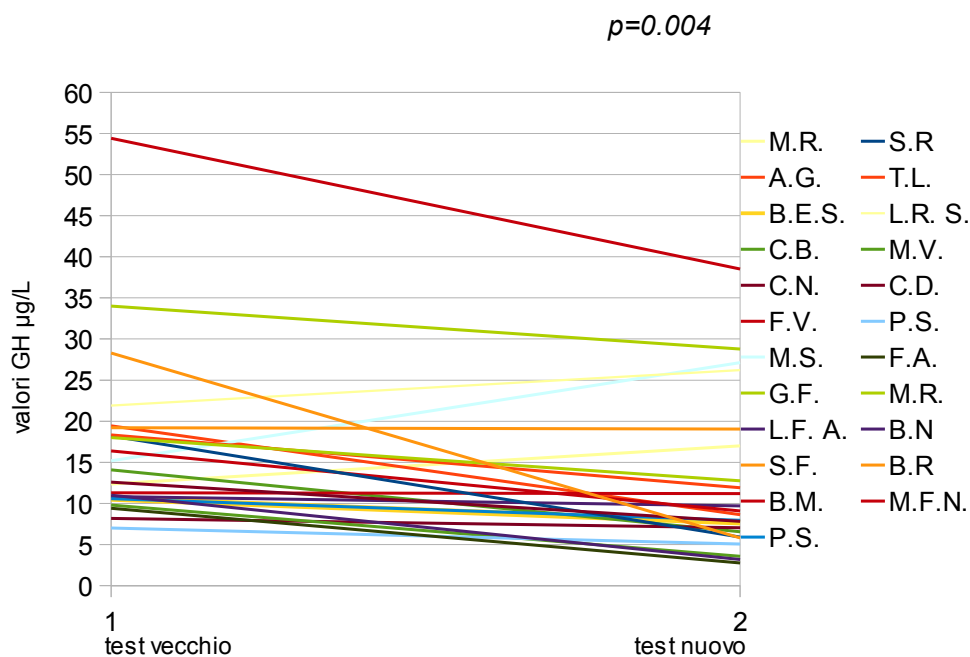


Figura 8.

Già ad un primo esame, come evidente in figura 7, i pazienti sottoposti al test di stimolo di tolleranza insulinica (ITT) con il metodo antecedente a settembre 2009: IMMULITE®, calibrato con lo standard IS 80/505 mostrano valori di picco di GH più alti rispetto a quando testati con il test ACCESS ultrasensitive hGH, utilizzando

lo Standard IS 98/754-

Attraverso il test statistico T di Student a due code per campioni dipendenti abbiamo dimostrato che questa differenza è statisticamente significativa con un $p \text{ value} < 0,05$.

$t(22) = 3.18, p = 0.004$.

Esiste una correlazione tra i due metodi e tale correlazione è uguale a 0.75 (Fig.8)

Questo sta a significare che, per quanto i valori del picco di GH misurati con il nuovo test siano minori rispetto a quelli riscontrati con la metodica utilizzata in precedenza, si è mantenuta una proporzionalità tra i pazienti. Ovvero coloro che avevano valori di picco più alti, rispetto ad altri pazienti, con la vecchia metodica continueranno ad avere picchi più alti rispetto agli altri, per quanto il valore assoluto del picco del GH sia diminuito.

Stimolo impiegato L-DOPA:

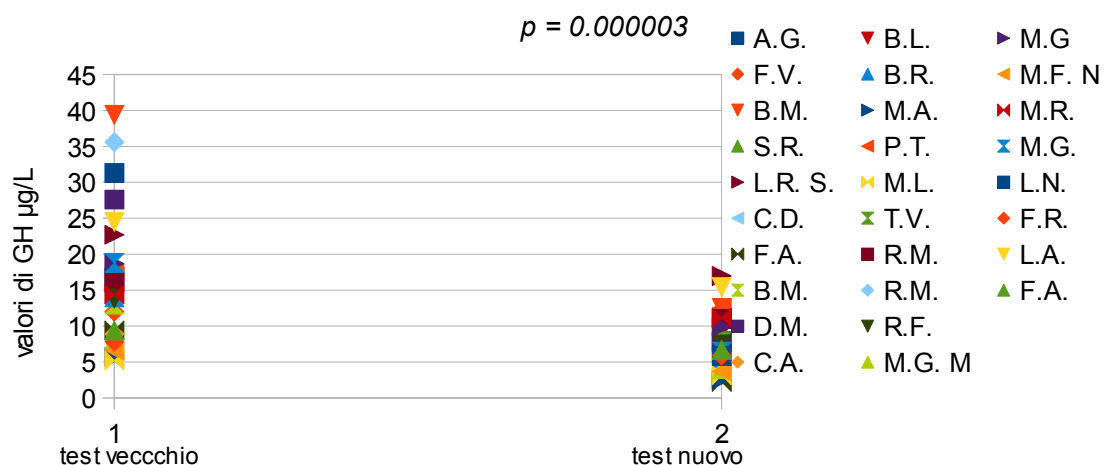


Figura 9.

Anche i valori dei pazienti sottoposti al test di stimolo L-DOPA con il Kit impiegato fino a settembre 2009 IMMULITE ® sembravano mostrare valori di picco di GH più alti rispetto a quando testati con il nuovo test ACCESS ultrasensitive hGH, introdotto da settembre 2009. (Fig. 9) Questa relazione si è dimostrata statisticamente significativa con un valore di $p = 0.000003$.

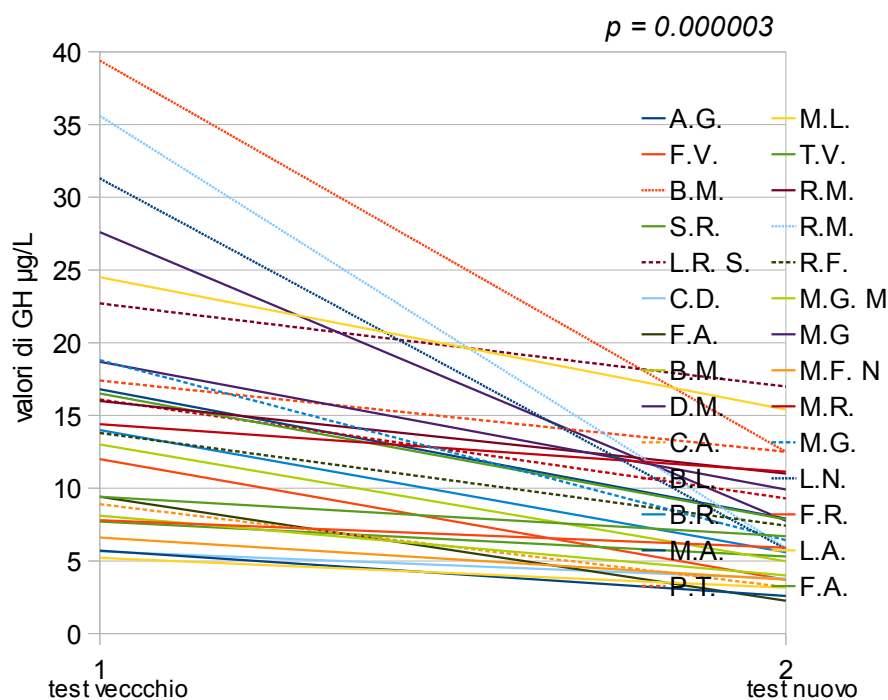
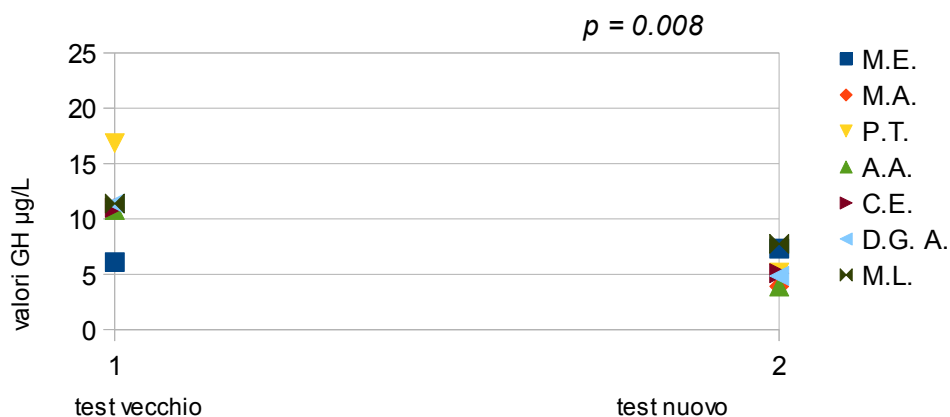


Figura 10.

Anche in questo caso, sempre con il test T di Student si è osservata una correlazione tra i campioni pari a 0.55 come illustrato graficamente in figura 10. $t(27) = 5.94$, $p = 0.000003$; anche in questo caso significa che, per quanto i valori del picco di GH misurati con il nuovo metodo siano minori rispetto a quelli riscontrati con la metodica utilizzata in precedenza, si è mantenuta una proporzionalità tra i pazienti.



I 7 pazienti sottoposti allo stimolo con l'ARGININA con il nuovo kit ACCESS ultrasensitive hGH, introdotto da settembre 2009 sembravano mostrare valori di picco di GH più bassi rispetto ai dosaggi con il Kit impiegato fino a settembre 2009 IMMULITE ® (Fig 11.)

Questa osservazione si è rivelata statisticamente significativa con un valore di $p = 0,008$

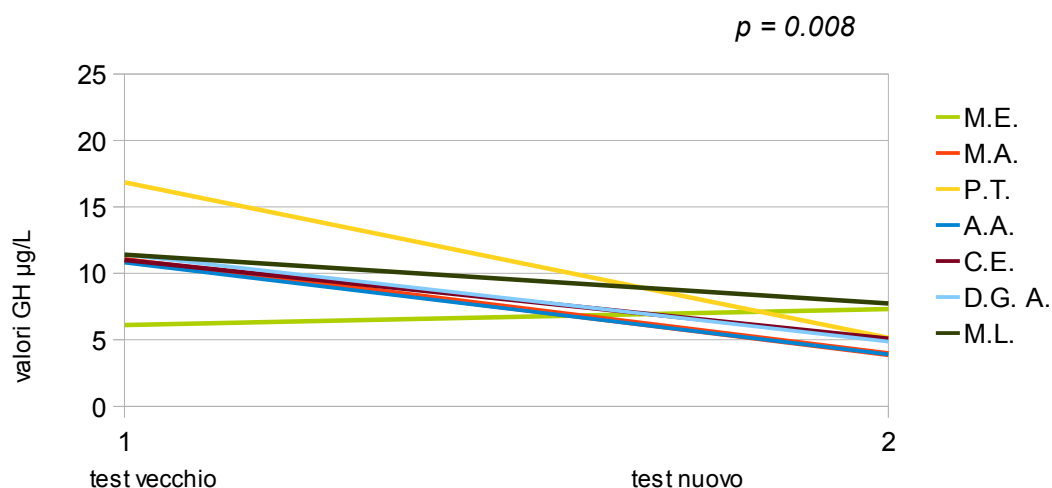


Figura 12.

La correlazione anche in questo caso è mantenuta, ma probabilmente a causa della scarsa numerosità del campione, ha un valore negativo di -0,35.

Paziente	IMMULITE Picco Gh(μ g/L)	GHS/GHD	GHS/GHD	ACCESS Picco Gh(μ g/L)
A.G.	16,8	GHS	GHD	7,9
F.V.	12	GHS	GHD	3,7
B.M.	39,4	GHS	GHS	12,5
S.R.	7,7	GHD	GHD	5,3
L.R. S.	22,7	GHS	GHS	16,98
C.D.	5,65	GHD	GHD	3,77
F.A.	9,4	GHD	GHD	2,25
B.M.	13	GHS	GHD	4,97
D.M.	27,6	GHS	GHD	7,76
C.A.	8,9	GHD	GHD	3,2
B.L.	16,1	GHS	GHS	9,3
B.R.	14	GHS	GHD	5,6
M.A.	5,7	GHD	GHD	2,59
P.T.	17,4	GHS	GHS	12,5
M.L.	5,2	GHD	GHD	3,15
T.V.	16,5	GHS	GHD	7,86
R.M.	16	GHS	GHS	11
R.M.	35,6	GHS	GHD	5,89
R.F.	13,8	GHS	GHD	7,42
M.G. M	8,1	GHD	GHD	4
M.G	18,7	GHS	GHS	9,9
M.F. N	6,6	GHD	GHD	3,7
M.R.	14,4	GHS	GHS	11,13
M.G.	18,8	GHS	GHD	6,43
L.N.	31,3	GHS	GHD	5,82
F.R.	7,8	GHD	GHD	5,9
L.A.	24,5	GHS	GHS	15,4
F.A.	9,4	GHD	GHD	6,7

Tabella 2: pazienti sottoposti al L-DOPA test

All'interno del gruppo di pazienti sottoposti al L-DOPA test si nota che:

tra i bambini analizzati con il metodo IMMULITE ® calibrato con IS 80/505 antecedente a settembre 2009: i campioni di 10 pazienti su 28, corrispondenti ad una percentuale del 35,7% riportano un valore di picco di GH inferiore a 10 µg/L. 18 pazienti invece, corrispondenti al 64,3%, risultano rispondere positivamente allo stimolo con valori superiori al cut off (tabella 2).

La misurazione con il nuovo kit ACCESS riporta per lo stesso campione valori superiori ad 8 µg/L (nuovo cut off adottato) in una quota di 8 pazienti su 28, gli altri 20 pazienti risulterebbero così GHD.

Dunque la percentuale di test risultanti inferiori al cut off e quindi indicativi di GHD passa da 35,7% a 71,4% mentre la quota di all'interno dello stesso campione di pazienti rispondenti al test cala dal 64,3% al 28,6%.

10 sono i pazienti valutati come GHS col primo test che adesso risultano GHD. Se avessimo mantenuto il cut off di 10 µg/L 2 pazienti GHS sarebbero stati considerati GHD. se portassimo il cut off da 8 a 7 ci sarebbero 4 pazienti in più risultati GHS al test vecchio che risulterebbero GHS (più conforme al precedente)

Paziente	IMMULITE Picco Gh(μ g/L)	GHS/GHD	GHS/GHD	ACCESS Picco Gh(μ g/L)
M.R.	12,37	GHS	GHS	17,01
A.G.	19,43	GHS	GHS	8,63
B.E.S.	10,57	GHS	GHD	7,7
C.B.	14,1	GHS	GHD	6,55
C.N.	8,2	GHD	GHD	7,04
F.V.	11,3	GHS	GHS	11,2
M.S.	15,2	GHS	GHS	27,11
G.F.	34	GHS	GHS	28,8
L.F. A.	10,84	GHS	GHS	9,7
S.F.	19,2	GHS	GHS	19,06
B.M.	16,4	GHS	GHS	9,1
P.S.	10,6	GHS	GHD	7,95
S.R	18,2	GHS	GHD	5,91
T.L.	18,34	GHS	GHS	11,9
L.R. S.	21,9	GHS	GHS	26,21
M.V.	9,8	GHD	GHD	3,59
C.D.	12,6	GHS	GHD	7,82
P.S.	7	GHD	GHD	5,07
F.A.	9,4	GHD	GHD	2,77
M.R.	18	GHS	GHS	12,75
B.N	11	GHS	GHD	3,19
B.R	28,3	GHS	GHD	5,8
M.F.N.	54,4	GHS	GHS	38,5

Tabella 3: pazienti sottoposti all'ITT

All'interno del gruppo di pazienti sottoposti al test itt si nota che: nel gruppo di pazienti analizzati con il metodo IMMULITE ® calibrato con IS 80/505 antecedente a settembre 2009 i campioni di 4 pazienti su 23 scorrispondenti ad una percentuale del 17,4% riportano un valore di picco di GH inferiore a 10 µg/L.

19 pazienti invece, corrispondenti all'82,6%, risultano rispondere positivamente allo stimolo con valori superiori al cut off (tabella 2).

La misurazione con il nuovo kit ACCESS riporta per lo stesso campione valori superiori ad 8 µg/L (nuovo cut off adottato) in una quota di 12 pazienti su 23, gli altri 11 pazienti risulterebbero così GHD.

Paziente	IMMULITE Picco Gh(µg/L)	GHS/GHD	GHS/GHD	ACCESS Picco Gh(µg/L)
M.E.	6,1	GHD	GHD	7,32
M.A.	11	GHS	GHD	3,92
P.T.	16,85	GHS	GHD	5,14
A.A.	10,8	GHS	GHD	3,9
C.E.	11	GHS	GHD	5,09
D.G. A.	11,4	GHS	GHD	4,86
M.L.	11,4	GHS	GHD	7,74

Tabella 4: pazienti sottoposti a stimolo con Arginina

I campioni dei pazienti sottoposti a stimolo con Arginina misurati con il Kit IMMULITE ® calibrato con IS 80/505 antecedente a settembre 2009: risultano GHS in 6 pazienti su 7 (85,7%) e solo un paziente non risponde al test con un valore inferiore al cut-off di 10 µg/L (14,3%).

La misurazione con il nuovo kit ACCESS riporta per lo stesso campione valori inferiori ad 8 µg/L nella totalità dei pazienti.

Se il cut off da 8 passasse a 7 ci sarebbero 2 pazienti in più che risulterebbero GHS.

In totale prima 15 bambini su 58 venivano considerati GHD , contro 27 su 58 attuali. La percentuale che prima ammontava a 25,9% ora ammonta al 46,5%.

5-DISCUSSIONE

Questo lavoro conferma una maggior prevalenza di bassa statura imputabile a GHD nel sesso maschile [26, 84].

Questa diversa distribuzione di genere è riscontrata spesso in studi di questo tipo: nel recente lavoro di Binder et al. riguardante il cut off biochimico ricavato sulla base di dati auxologici , nel quale l'autore esamina 52 pazienti, si rende evidente questa maggior prevalenza di GHD nel sesso maschile, ma la differenza è ancor maggiore nella popolazione totale di 349 bambini inizialmente valutata [85]. Da questo si evince che oltre ad essere il deficit di GH più frequente nel sesso maschile rispetto a quello femminile [86], è vero anche che le bambine sono

condotte all'attenzione del pediatra meno frequentemente rispetto ai bambini maschi, per quanto concerne problemi riguardanti la crescita, fatto che si rende evidente già in studi datati [87].

Questo è probabilmente dovuto ad una ragione sociale che spinge i genitori a portare il bambino dal pediatra in maniera più solerte per problemi di crescita quando questi affliggano un maschio piuttosto che una femmina [26].

Già ad un primo esame, come evidente in figura 7 e in figura 9, i pazienti sottoposti al test di stimolo di tolleranza insulinica (ITT) e (L-DOPA) con il metodo antecedente a settembre 2009: IMMULITE®, calibrato con lo standard IS 80/505 mostrano valori di picco di GH più alti rispetto a quando testati con il test ACCESS ultrasensitive hGH, utilizzando lo Standard IS 98/754, dato confermato con il T di Student mostratosi significativo con un $p \text{ value} < 0,05$

Il fatto che esista una correlazione tra i due metodi e tale correlazione sia positiva (Fig.8 e Fig. 10) sta a significare che, per quanto i valori del picco di GH misurati con il nuovo calibratore siano minori rispetto a quelli riscontrati con la metodica utilizzata in precedenza, si è mantenuta una proporzionalità tra i pazienti. Ovvero coloro che avevano valori di picco più alti rispetto ad altri pazienti, con la vecchia metodica continueranno ad avere picchi più alti rispetto agli altri anche nella nuova misurazione, per quanto il valore assoluto del picco del GH sia diminuito.

Per quanto concerne il test dell'Arginina: per quanto sia evidente (Fig. 11) anche in questo caso che la metodica utilizzando lo standard nuovo IS 98/574 riporti valori

minori rispetto al precedente e che questa osservazione sia statisticamente significativa con un p value $<0,05$, la correlazione in questo caso sembrerebbe essere inversa, ovvero chi aveva valori più alti rispetto agli altri con la vecchia metodica riporterebbe valori maggiori rispetto agli altri. Questo è chiaramente un errore dovuto al fatto che, rispetto alle popolazioni che hanno effettuato gli altri due test provocativi, il campione dell'arginina è poco rappresentato, contando in tutto sette pazienti.

All'interno del gruppo di pazienti sottoposti al test ITT si nota che: con il passaggio dal dosaggio IMMULITE® calibrato con lo standard IS 80/505 all'ACCESS utilizzante 98/574, la percentuale di test inferiori al cut off e quindi indicativi di GHD aumenta passando da 17,4% a 47,8%.

Mentre la quota di all'interno dello stesso campione di pazienti rispondenti al test cala dal 82,6% al 52,2%.

Se avessimo mantenuto il cut off di 10 $\mu\text{g/L}$ 3 pazienti in più ad oggi considerati GHS sarebbero stati considerati GHD.

6 sono i pazienti valutati come GHS col primo test che adesso risultano GHD. Se portassimo il cut off da 8 a 7 ci sarebbero 2 pazienti in più risultati GHS al test IMMULITE® e GHD al kit ACCESS, che risulterebbero GHS (con un risultato più conforme al precedente).

All'interno del gruppo di pazienti sottoposti al L-DOPA test si nota che: con il passaggio dal dosaggio IMMULITE® calibrato con lo standard IS 80/505 all'ACCESS utilizzante 98/574, la percentuale di test risultanti inferiori al cut off e quindi indicativi di GHD passa da 35,7% a 71,4% mentre la quota di all'interno

dello stesso campione di pazienti rispondenti al test cala dal 64,3% al 28,6%.

10 sono i pazienti valutati come GHS col primo test che adesso risultano GHD

Se avessimo mantenuto il cut off di 10 µg/L altri 2 pazienti GHS sarebbero stati considerati GHD.

Se portassimo il cut off da 8 a 7 ci sarebbero 4 pazienti in più risultati GHS al test vecchio che risulterebbero GHS (con un risultato più conforme al precedente).

All'interno del gruppo di pazienti sottoposti al test ARGININA si nota che con il passaggio dal dosaggio IMMULITE® calibrato con lo standard IS 80/505 all'ACCESS utilizzando 98/574, la percentuale di GHS passa dall' 85,7% allo 0% e i GHD passano dal 14,3% al 100%. Se il cut off da 8 passasse a 7 ci sarebbero 2 pazienti in più che risulterebbero GHS.

Con la conferma dunque della diminuzione dei valori ottenuti con gli immunodosaggi passando dal vecchio standard 80/505 al nuovo 98/574 [88], si rendeva necessario un adeguamento dei cut off per il rischio di sovrastimare i GHD.

Il valore soglia è stato abbassato, ma forse si renderebbe necessario un'ulteriore adeguamento dello stesso verso un valore più basso, per esempio 7 ng/mL.

In totale prima 15 bambini su 58 venivano considerati GHD, contro 27 su 58 attuali. La percentuale che prima ammontava a 25,9% ora ammonta al 46,5%.

Se per esempio si adottasse un cut off di 7 ng/mL sarebbero 19 su 58 i campioni valutati GHD, percentuale del 32,7% che si avvicina più alla situazione di partenza valutata con metodiche e valori-soglia antecedenti il 2009.

6-CONCLUSIONI

Il dosaggio dell'ormone della crescita è fondamentale per la diagnosi di deficit di GH nei bambini. Certamente non è l'unico strumento, ma affiancando la clinica si rende indispensabile nella gestione del paziente di bassa statura. Molti fattori possono però influenzare la misurazione del GH producendo risultati discrepanti tra differenti laboratori. Dal momento che si tratta di dati di fondamentale importanza per decidere se iniziare la terapia o meno, una ulteriore standardizzazione nel dosaggio dell'ormone della crescita risulta necessaria.

In questo studio abbiamo valutato l'impatto di differenti calibratori sui valori ottenuti dal dosaggio dell'ormone della crescita e la relazione di questi dati con gli ultimi due cut off proposti, rispettivamente di 10 ng/mL e il più recente di 8 ng/mL. I dati ottenuti hanno confermato che il calibratore 98/574 fornisce valori più bassi di GH rispetto a quello di derivazione ipofisaria, confermando gli studi di Carrozza et al.[89] e di Meazza et al.[89].

Questo studio si pone in continuità con i recenti lavori riguardanti l'armonizzazione del dosaggio del GH e la appropriatezza dei cut off proposti [62, 90] . In accordo con le più recenti raccomandazioni internazionali sulla standardizzazione del dosaggio del GH, solo la forma ricombinante da 22 kDa dovrebbe essere impiegata come calibratore e il valore dell'ormone della crescita espresso in termini di unità massa[62]

Già il fatto che ormai si utilizzi pressochè esclusivamente lo IS 98/574, rappresenta un passo avanti nella standardizzazione, così come un passo avanti è stata l'adozione del nuovo cut-off di 8 ng/mL, che si rendeva necessaria ormai da anni. Da questo lavoro emerge che il cut off potrebbe essere ulteriormente abbassato per evitare di sovrastimare il GHD, ma ulteriori studi sono necessari a riguardo.

BIBLIOGRAFIA

1. Melmed, S. and J.L. Jameson, *Malattie dell'ipofisi anteriore e dell'ipotalamo*, in *Harrison Principi di medicina interna*, A. Fauci, E. Braunwald, and D.E. Kasper, McGraw-Hill, Editor 2009: Milano [etc.]. p. 2123-2143.
2. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Fisiologia Medica*, ed. Edises 2001.
3. Vijayakumar, A., et al., *Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism*. Growth Horm IGF Res, 2010. **20**(1): p. 1-7.
4. Mullis, P.E., *Genetics of isolated growth hormone deficiency*. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2010. **2**(2): p. 52-62.
5. Dattani, M. and M. Preece, *Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment*. Lancet, 2004. **363**(9425): p. 1977-87.
6. Nathan, B. and D. Allen, *Growth hormone treatment*, in *Pediatric Endocrinology*, F. Lifshitz, Editor 2007.
7. Richmond, E.J. and A.D. Rogol, *Growth hormone deficiency in children*. Pituitary, 2008. **11**(2): p. 115-20.
8. Date, Y., et al., *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4255-61.
9. Ballesteros, M., et al., *Distribution and abundance of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor isoforms in human tissues*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2865-71.
10. Cunningham, B.C., et al., *Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule*. Science, 1991. **254**(5033): p. 821-5.
11. Salmon, W.D., Jr. and W.H. Daughaday, *A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1957. **49**(6): p. 825-36.
12. Giustina, A. and J.D. Veldhuis, *Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human*. Endocr Rev, 1998.

- 19(6): p. 717-97.
13. Le Roith, D., et al., *The somatomedin hypothesis: 2001*. Endocr Rev, 2001. **22**(1): p. 53-74.
 14. Waters, M.J. and A.J. Brooks, *Growth hormone receptor: structure function relationships*. Horm Res Paediatr, 2011. **76 Suppl 1**: p. 12-6.
 15. David, A., et al., *Evidence for a continuum of genetic, phenotypic, and biochemical abnormalities in children with growth hormone insensitivity*. Endocr Rev, 2011. **32**(4): p. 472-97.
 16. Yakar, S., H.W. Courtland, and D. Clemmons, *IGF-I and bone: New discoveries from mouse models*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2010. **25**(12): p. 2543-52.
 17. Pasarica, M., et al., *Effect of growth hormone on body composition and visceral adiposity in middle-aged men with visceral obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(11): p. 4265-70.
 18. Farnier, C., et al., *Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway*. International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity, 2003. **27**(10): p. 1178-86.
 19. Norrelund, H., A.L. Riis, and N. Moller, *Effects of GH on protein metabolism during dietary restriction in man*. Growth Horm IGF Res, 2002. **12**(4): p. 198-207.
 20. Verhelst, J. and R. Abs, *Cardiovascular risk factors in hypopituitary GH-deficient adults*. Eur J Endocrinol, 2009. **161 Suppl 1**: p. S41-9.
 21. Bouillon, R. and A. Prodonova, *Growth and hormone deficiency and peak bone mass*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2000. **13 Suppl 6**: p. 1327-36.
 22. Walker, J.L., J.J. Van Wyk, and L.E. Underwood, *Stimulation of statural growth by recombinant insulin-like growth factor I in a child with growth hormone insensitivity syndrome (Laron type)*. J Pediatr, 1992. **121**(4): p. 641-6.
 23. Ohlsson, C., et al., *Growth hormone induces multiplication of the slowly cycling germinal cells of the rat tibial growth plate*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(20): p. 9826-30.
 24. Tanner, J.M. and P.S. Davies, *Clinical longitudinal standards for height and height velocity for North American children*. J Pediatr, 1985. **107**(3): p. 317-29.
 25. Cohen, P., et al., *Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society,*

- the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop. J Clin Endocrinol Metab, 2008. 93(11): p. 4210-7.*
26. Lifshitz, F., *Worrisome Growth*, in *Pediatric Endocrinology*, F. Lifshitz, Editor 2007.
 27. Badaru, A. and D.M. Wilson, *Alternatives to growth hormone stimulation testing in children*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(6): p. 252-8.
 28. Hintz, R.L., *Eternal vigilance--mortality in children with growth hormone deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(5): p. 1691-2.
 29. Ranke, M.B., *Towards a consensus on the definition of idiopathic short stature*. Horm Res, 1996. **45 Suppl 2**: p. 64-6.
 30. Schnell, F.N. and J.R. Bannard, *Short Stature in Childhood and Adolescence: Part 1: Medical management*. Canadian family physician Medecin de famille canadien, 1991. **37**: p. 2206-13.
 31. Simm, P.J. and G.A. Werther, *Child and adolescent growth disorders--an overview*. Australian family physician, 2005. **34**(9): p. 731-7.
 32. Martin, D.D., et al., *The use of bone age in clinical practice - part 1*. Horm Res Paediatr, 2011. **76**(1): p. 1-9.
 33. Saggese, G., et al., *Diagnosis and treatment of growth hormone deficiency in children and adolescents: towards a consensus. Ten years after the Availability of Recombinant Human Growth Hormone Workshop held in Pisa, Italy, 27-28 March 1998*. Horm Res, 1998. **50**(6): p. 320-40.
 34. Juul, A., et al., *European audit of current practice in diagnosis and treatment of childhood growth hormone deficiency*. Horm Res, 2002. **58**(5): p. 233-41.
 35. Webb, E.A. and M.T. Dattani, *Diagnosis of growth hormone deficiency*. Endocr Dev, 2010. **18**: p. 55-66.
 36. Rosenbloom, A.L. and E.L. Connor, *Hypopituitarism and Other Disorders of the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor-I Axis*, in *Pediatric Endocrinology*, F. Lifshitz, Editor 2007.
 37. Sizonenko, P.C., et al., *Diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence. Part 1: diagnosis of growth hormone deficiency*. Growth Horm IGF Res, 2001. **11**(3): p. 137-65.
 38. Guazzarotti, L. and G. Zuccotti, *Malattie della tiroide*, in *Manuale di pediatria. La pratica clinica: per la formazione di studenti di medicina e chirurgia e*

specializzandi in pediatria, Esculapio, Editor 2012.

39. Kaufman, F.R., et al., *Neonatal cholestasis and hypopituitarism*. Archives of disease in childhood, 1984. **59**(8): p. 787-9.
40. Copeland, K.C., R.C. Franks, and R. Ramamurthy, *Neonatal hyperbilirubinemia and hypoglycemia in congenital hypopituitarism*. Clin Pediatr (Phila), 1981. **20**(8): p. 523-6.
41. Urzola, A., J. Leger, and P. Czernichow, *Three cases of congenital growth hormone deficiency with micropenis and hypospadias: what does growth hormone have to do with it?* Horm Res, 1999. **51**(2): p. 101-4.
42. Laron, Z., *Disorders of growth hormone resistance in childhood*. Current opinion in pediatrics, 1993. **5**(4): p. 474-80.
43. Rimoim, D.L., T.J. Merimee, and V.A. McKusick, *Sexual ateliotic dwarfism: a recessively inherited isolated deficiency of growth hormone*. Transactions of the Association of American Physicians, 1966. **79**: p. 297-311.
44. *Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society*. GH Research Society. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(11): p. 3990-3.
45. Hokken-Koelega, A.C., *Diagnostic workup of the short child*. Horm Res Paediatr, 2011. **76 Suppl 3**: p. 6-9.
46. Seaver, L.H. and M. Irons, *ACMG practice guideline: genetic evaluation of short stature*. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 2009. **11**(6): p. 465-70.
47. Rosenfeld, R.G., et al., *Diagnostic controversy: the diagnosis of childhood growth hormone deficiency revisited*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(5): p. 1532-40.
48. Bayley, N. and S.R. Pinneau, *Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with the Greulich-Pyle hand standards*. J Pediatr, 1952. **40**(4): p. 423-41.
49. Arslanoglu, I., et al., *Diagnostic value of pituitary MRI in differentiation of children with normal growth hormone secretion, isolated growth hormone deficiency and multiple pituitary hormone deficiency*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2001. **14**(5): p. 517-23.
50. Osorio, M.G., et al., *Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5076-84.

51. Hindmarsh, P.C. and P.G. Swift, *An assessment of growth hormone provocation tests*. Archives of disease in childhood, 1995. **72**(4): p. 362-7; discussion 367-8.
52. Crowley, S., et al., *Reproducibility of the cortisol response to stimulation with a low dose of ACTH(1-24): the effect of basal cortisol levels and comparison of low-dose with high-dose secretory dynamics*. J Endocrinol, 1993. **136**(1): p. 167-72.
53. Gandrud, L.M. and D.M. Wilson, *Is growth hormone stimulation testing in children still appropriate?* Growth Horm IGF Res, 2004. **14**(3): p. 185-94.
54. Hughes, I.A., *Handbook of Endocrine Investigations in Children*, ed. Butterworth-Heinemann 1986. 166.
55. Hindmarsh, P.C., et al., *The interaction of growth hormone releasing hormone and somatostatin in the generation of a GH pulse in man*. Clin Endocrinol (Oxf), 1991. **35**(4): p. 353-60.
56. Saggese, G., et al., *Physiological assessment of growth hormone secretion in the diagnosis of children with short stature*. Pediatrician, 1987. **14**(3): p. 121-37.
57. Shah, A., R. Stanhope, and D. Matthew, *Hazards of pharmacological tests of growth hormone secretion in childhood*. BMJ, 1992. **304**(6820): p. 173-4.
58. Youlton, R., S.L. Kaplan, and M.M. Grumbach, *Growth and growth hormone. IV. Limitations of the growth hormone response to insulin and arginine and of the immunoreactive insulin response to arginine in the assessment of growth hormone deficiency in children*. Pediatrics, 1969. **43**(6): p. 989-1004.
59. Butler, G.E., M. McKie, and S.G. Ratcliffe, *The cyclical nature of prepubertal growth*. Annals of human biology, 1990. **17**(3): p. 177-98.
60. Hindmarsh, P., et al., *The relationship between height velocity and growth hormone secretion in short prepubertal children*. Clin Endocrinol (Oxf), 1987. **27**(5): p. 581-91.
61. Chaler, E., et al., *Between-assay differences in serum growth hormone (GH) measurements: importance in the diagnosis of GH deficiency in childhood*. Clin Chem, 2001. **47**(9): p. 1735-8.
62. Ross, H.A., E. Lentjes, and P.P. Menheere, *The consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays lacks a recommendation to attempt efficacious harmonization*. Clin Chem, 2011. **57**(10): p. 1463; author reply 1463-4.
63. Tanaka, T., et al., *A nationwide attempt to standardize growth hormone assays*. Horm Res, 2005. **64 Suppl 2**: p. 6-11.

64. Andersson, A.M., et al., *Interpretation of growth hormone provocative tests: comparison of cut-off values in four European laboratories*. Eur J Endocrinol, 1995. **132**(3): p. 340-3.
65. Boscato, L.M. and M.C. Stuart, *Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays*. Clin Chem, 1988. **34**(1): p. 27-33.
66. Glick, S.M., et al., *The Regulation of Growth Hormone Secretion*. Recent progress in hormone research, 1965. **21**: p. 241-83.
67. Wieringa, G.E., J.H. Barth, and P.J. Trainer, *Growth hormone assay standardization: a biased view?* Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **60**(5): p. 538-9.
68. Butler, J., *Biochemical tests of growth hormone status in short children*. Ann Clin Biochem, 2001. **38**(Pt 1): p. 1-2.
69. Bidecci, G. and C. Meazza, *La diagnosi di deficit di ormone della crescita può dipendere dalle metodiche di laboratorio utilizzate?* Bollettino della Società Medico Chirurgica di Pavia, 2011. **124**(4): p. 749-753.
70. Bristow, A.F. and A.M. Jespersen, *The Second International Standard for somatropin (recombinant DNA-derived human growth hormone): preparation and calibration in an international collaborative study*. Biologicals, 2001. **29**(2): p. 97-106.
71. Bangham, D.R., R.E. Gaines Das, and D. Schulster, *The International Standard for Human Growth Hormone for Bioassay: calibration and characterization by international collaborative study*. Mol Cell Endocrinol, 1985. **42**(3): p. 269-82.
72. Trainer, P.J., et al., *Consensus statement on the standardisation of GH assays*. Eur J Endocrinol, 2006. **155**(1): p. 1-2.
73. AIFA. www.agenziafarmaco.gov.it. 08/2014 [cited 2014 01/10].
74. Bacchi Reggiani, M.L.B.C., A. , *Affidabilità dei test diagnostici- Il cut off e la curva ROC*, in *Principi di Statistica ed Epidemiologia : Per le lauree sanitarie*, Esculapio, Editor 2006: Bologna.
75. Blizzard, R.M., *History of growth hormone therapy*. Indian J Pediatr, 2012. **79**(1): p. 87-91.
76. Loche, S., et al., *Growth hormone treatment in non-growth hormone-deficient children*. Annals of pediatric endocrinology & metabolism, 2014. **19**(1): p. 1-7.
77. Baxter, L., et al., *Recombinant growth hormone for children and adolescents with Turner syndrome*. The Cochrane database of systematic reviews, 2007(1): p. CD003887.

78. Blum, W.F., et al., *Growth hormone is effective in treatment of short stature associated with short stature homeobox-containing gene deficiency: Two-year results of a randomized, controlled, multicenter trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 219-28.
79. Mehls, O., et al., *Growth hormone treatment in short children with chronic kidney disease*. Acta paediatrica, 2008. **97**(9): p. 1159-64.
80. Deal, C.L., et al., *GrowthHormone Research Society workshop summary: consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(6): p. E1072-87.
81. Noordam, C., et al., *Long-term GH treatment improves adult height in children with Noonan syndrome with and without mutations in protein tyrosine phosphatase, non-receptor-type 11*. Eur J Endocrinol, 2008. **159**(3): p. 203-8.
82. Van Pareren, Y., et al., *Adult height after long-term, continuous growth hormone (GH) treatment in short children born small for gestational age: results of a randomized, double-blind, dose-response GH trial*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(8): p. 3584-90.
83. van Dijk, M., et al., *Risk factors for diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome are comparable for previously growth hormone-treated young adults born small for gestational age (sga) and untreated short SGA controls*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 160-5.
84. Lindsay, R., et al., *Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency*. J Pediatr, 1994. **125**(1): p. 29-35.
85. Binder, G., et al., *Auxology-based cut-off values for biochemical testing of GH secretion in childhood*. Growth Horm IGF Res, 2011. **21**(4): p. 212-8.
86. Dattani, M.T., *Novel insights into the aetiology and pathogenesis of hypopituitarism*. Horm Res, 2004. **62 Suppl 3**: p. 1-13.
87. Vimpani, G.V., et al., *Prevalence of severe growth hormone deficiency*. British medical journal, 1977. **2**(6084): p. 427-30.
88. Meazza, C., et al., *Diagnosis of growth hormone deficiency is affected by calibrators used in GH immunoassays*. Horm Metab Res, 2012. **44**(12): p. 900-3.
89. Carrozza, C., et al., *Human growth hormone (GH) immunoassay: standardization and clinical implications*. Clin Chem Lab Med, 2011. **49**(5): p. 851-3.
90. Muller, A., et al., *Harmonization of growth hormone measurements with different immunoassays by data adjustment*. Clin Chem Lab Med, 2011. **49**(7): p. 1135-42.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Giuseppe Saggese, per avermi dato la possibilità di frequentare il reparto di Endocrinologia Pediatrica e di approfondirne lo studio.

Un ringraziamento a tutti coloro che ho incontrato nel corso della frequenza in reparto.

...E poi grazie a tutti.